No d'ordre AO 5228.

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Mireille BERST
licenciée ès-Sciences

ETUDE DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE DES LIPOPOLYSACCHARIDES SYNTHETISES PAR LES MUTANTS T1 DES SALMONELLES.

Soutenue le 23 Janvier 1971 devant la Commission d'examen

Mr. J.P. EBEL	Président
Mme. M. BRINI	Examinateurs
Mr. O. WESTPHAL	Examinateurs

No d'ordre

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Mireille BERST
licenciée ès-Sciences

ETUDE DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE DES LIPOPOLYSACCHARIDES SYNTHETISES PAR LES MUTANTS T1 DES SALMONELLES.

Soutenue le 23 Janvier 1971 devant la Commission d'examen

Mr. J.P. EBEL		Président
Mme. M. BRINI	}	Examinateurs
Mr. O. WESTPHAL	}	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition de Juin 1970

Doyen : Professeur J.H.VIVIEN

Doyens Honoraires : A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE, G.MILLOT.

Professeurs Honoraires : P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN, G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN, J.DENY, Ch.EHRESMANN, M.FRECHET, Mle S.GILLET, A.HEE, R.HOCART, A.KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER, A.LICHNEROWICZ, H.J.MARESQUELLE, L.NEEL, Ch.SADRON, F.TERROINE, H.VILLAT, H.WEISS, Et. WOLFF, J.YVON.

Maître de Conférence Honoraire : R.WEIL.

Professeurs :

H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
Mle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET .....T.T.P.		Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F.STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique

J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	MAthématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONGCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme BRINI M.	T.T.P.	Chimie
H. DURANTON	T.T.P.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	T.T.P.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	T.	Physique théorique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères industriels

P.A. MEYER ..... T.T.P. Mathématiques
G. WEILL ..... P.S.C. Physique
J.M. BLOCH ..... T. Chimie
A. CLAUSS ..... P.S.C. Chimie
E. FOLLENIUS ..... P.S.C. Zoologie
J. LUCAS ..... T T.P. Géologie
J.J. THIEBOLD ..... P.S.C. Biologie animale
G. GLAESER ..... T. Mathématiques
J.H. WEIL ..... P.S.C. Chimie biologique
D. FOATA ..... T.T.P. Mathématiques
H. DANAN ..... P.S.C. Physique
X. FERNIQUE ..... P.S.C. Mathématiques
F. GAUTIER ..... P.S.C. Physique
G. SUTTER ..... P.S.C. Physique électronique
V. AVANISSIAN ..... T. Analyse supérieure
F. LACROUTE ..... T. Biologie végétale
J.P. EBERHART ..... P.S.C. Minéralogie
Mme D. CAGNIANT ..... P.S.C. Chimie
J. STREITH ..... P.S.C. Chimie
J.M. LEHN ..... P.S.C. Chimie
Cl. ROBERT ..... P.S.C. Physique
A. GIRARDIE ..... P.S.C. Biologie animale
F. BECKER ..... P.S.C. Physique mathématique
M. KAROUBI ..... P.S.C. Mathématiques
A. MIGNOT .....P.S.C. Mathématiques appliquées

Professeurs associés :

A. BANDERET (E.A.H.P.) - H. HAKEN (Physique) -

Maîtres de Conférences et Chargés d'enseignement :

Mme WINTER Chr. ..... Physique
M. GOUNOT ..... Botanique
J. DEHAND ..... Chimie minérale
J. PRADINES ..... Mathématiques
R. GERARD ..... Mathématiques
J. ROUX ..... Botanique
R. VOLTZ ..... Physique théorique
A. MICHARD ..... Géologie
Y. BOULANGER ..... Chimie biologique

D. DACUNHA-CASTELLE ..... Mathématiques
J.P. BRETAGNOLLE ..... Mathématiques
J.J. RIEHL ..... Chimie
Cl. DELLACHERIE ..... Mathématiques
J. FAURE ..... Chimie physique
M. GROSMANN ..... Physique
G. DUNOYER DE SEGONZAC ..... Géologie
A. CHARLIER ..... Physique
Fr. SCHMITT ..... Physique
E. BIANCO ..... Mathématiques
J. MARTINET ..... Mathématiques
J.P. JOUANOLOU ..... Mathématiques
Ph. ROPARTZ ..... Psycho-physiologie
Cl. TAVARD ..... Physique

Maître de Conférences associés :

E. DADE (Mathématiques) - M. DOSTAL (Mathématiques) - M. NIKOLIC (Physique corpusculaire) - J. WALSCH (Mathématiques) -

Secrétaire générale de la Faculté : G. SAINT-PE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548025_0011

Avant d'aborder l'exposé des résultats que nous soumettons à nos juges, nous tenons à rendre hommage à Monsieur le Professeur O. WESTPHAL, directeur du Max-Planck-Institut für Immunbiologie de Freiburg i. Br. Il nous a accueillie dans son Institut et donné la possibilité d'y faire le travail qui fait l'objet de cet exposé. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre très vive reconnaissance.

Madame M. BRINI, Professeur à l'Institut de Chimie de Strasbourg, nous a orientée vers la recherche et nous a aidée de ses précieux conseils. Nous lui en sommes très reconnaissante.

Monsieur J.P. EBEL, Professeur à l'Institut de Biochimie de la Faculté des Sciences de Strasbourg, nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Nous le remercions très sincèrement de son accueil bienveillant et d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement le Docteur O. LÜDERITZ, qui a inspiré , dirigé et encouragé nos recherches , ne ménageant ni son temps ni ses conseils. Nous sommes heureuse de pouvoir ici lui exprimer toute notre gratitude et notre affection pour son soutien constant et la très belle période passée dans son laboratoire.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur R. MINCK, Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Strasbourg, qui nous a ouvert la carrière de chercheur en nous permettant d'exercer les fonctions d'assistante de Sciences fondamentales dans son Institut.

Monsieur B. LINDBERG, Professeur à l'Institut de Chimie Organique de l'Université de Stockholm nous a permis de nous familiariser dans son laboratoire avec les techniques de méthylation des sucres. Qu'il veuille bien accepter l'expression de nos plus vifs remerciements.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont encouragée et aidée au cours de ce travail, Mademoiselle I. FROMME pour son aide dans les problèmes de chromatographie en phase gazeuse, Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur de chimie macromoléculaire à Lille, pour ses critiques pleines d'humour dans la présentation du travail, Mademoisell E. RUSCHMANN qui s'est intéressée à l'aspect sérologiqu et Monsieur S. SCHLECHT qui a bien voulu nous procurer les grandes quantités de bactéries nécessaires à cette étude.

Nos remerciements s'adressent enfin à toute la souriante équipe du laboratoire et tout particulièrement à Mademoiselle Inge MINNER , à Madame Hilde BUNK et à Madame Nele LEIBROCK dont la collaboration nous fut précieuse.

Nous sommes reconnaissante à la MAX-PLANCK Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Göttingen pour le soutien financier qu'elle nous a accordé.

INTRODUCTION

ET

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRUCTURE GENERALE DES COUCHES COMPOSANT LA SURFACE DES BACTERIES

A) Généralités

Depuis de nombreuses années les structures qui constituent la surface des bactéries ont fait l'objet d'un grand nombre de recherches. Cette surface joue un rôle important, pour les cellules bactériennes, dans le maintient de la forme spécifique, de la rigidité, de la protection, de la perméabilité sélective et des rapports bactérie/hôte dans les infections intestinales. Malgré une grande diversité, toutes les bactéries présentent des caractères fondamentaux. Elles sont constituées par un cytoplasme entouré d'une membrane fine (membrane cytoplasmique) et d'une couche plus épaisse (paroi). Celle-ci peut être, suivant les cas, entourée d'une capsule plus ou moins gélatineuse. La paroi comprend une structure tridimensionnelle sans doute responsable de sa rigidité, et diverses substances de remplissage en particulier l'antigène somatique. La coloration de Gram a permis de classer, en gros, les bactéries en deux grandes catégories: bactéries à gram positif ou à gram négatif.

B) Bactéries à gram positif

La constitution des parois de bactéries à gram positif est relativement moins complexe que celles des bactéries à gram négatif. Il existe d'abord un polymère commun à toutes les bactéries et qui peut atteindre un fort pourcentage chez les bactéries à gram positif où il a été particulièrement étudié (50 %) (Salton, Work). On lui a donné des dénominations diverses: mucopeptide, mureine ou peptidoglycane.

C'est un complexe qui possède un squelette polysaccharidique, constitué d'unités alternées de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique sur lesquelles se greffent des chaines peptidiques. Ces peptides sont constitués dans la plupart des cas par la L-alanine, l'acide

D-glutamique, la L-lysine ou l'acide diaminopimélique et la D-alanine. Les chaines polysaccharidiques, reliées entre elles par les chaines peptidiques forment un réseau tridimensionnel ce qui explique l'épaisseur de cette couche chez les bactéries à gram positif. On a signalé la présence d'acides teichoiques (Archibald et al. 1968). Ils peuvent être constitués par exemple par des chaines de polyribitol phosphate ou de polyglycérol phosphate auxquelles l'alanine est liée par une liaison ester (fig.1).

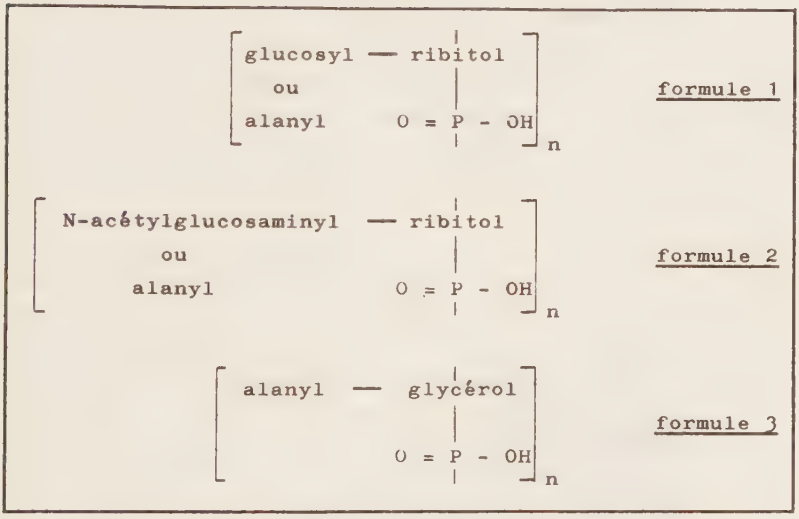


Figure 1

Unités de structure de trois différents acides teichoiques (Armstrong et al. 1959; Clark et al. 1962)

Les acides teichoiques, liés à des sucres, constituent des antigènes bactériens (Nathenson et al. 1966). En dehors de ces acides d'autres polysaccharides, constituant les capsules, ont pu être mis en évidence. Ces polymères ont des propriétés sérologiques importantes et jouent un grand rôle dans la spécificité antigénique des bactéries (Avery 1933; Perkins 1962; Janczura 1961; Nathenson 1962).

Si les parois de ces bactéries renferment des lipides et des protéines ce n'est qu'en faibles quantités (Salton 1956).

c) Parois des bactéries à gram négatif

Un symposium et quelques revues (Lüderitz et al. 1968a) ont été consacrés à l'étude des composés des parois de bactéries à gram négatif en 1966. Les paragraphes qui suivent rappelleront quelques traits essentiels de ces composés.

La structure des parois des bactéries à gram négatif est bien plus complexe. La figure 2 donne une représentation schématique de la paroi des Entérobactéries. Le peptidoglycane forme un réseau bidimentionnel (Weidel 1964) et sa contribution quantitative à la formation de la paroi est relativement faible.

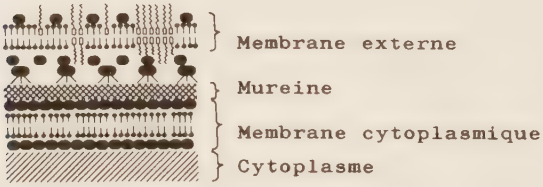


Figure 2

Représentation schématique de la structure de la paroi des Entérobactéries.

Phospholipide

Phosphoéthanolamine (polaire)
Diglycéride (apolaire)

Lipopolysaccharide

Polysaccharide (polaire)
Lipoide A (apolaire)

Protéine (complexée)
Protéine (liaison covalente)

(Rietschel, Thèse 1971)

D'autres polymères, protéines, lipides, lipopolysaccharides tiennent une plus grande place et se superposent à la structure rigide du peptidoglycane (Wheat et al. 1963,1964). Les lipides représentent jusqu'à 20% de la paroi (Salton 1953). Les protéines, les lipides et le péptidoglycane semblent avoir une composition similaire dans la plupart des espèces. Les Entérobactéries présentent une grande diversité en ce qui concerne les lipopolysaccharides. Leurs chaînes latérales oligosaccharidiques constituent les groupes déterminants spécifiques des antigènes polysaccharidiques bactériens. Ils sont appelés Antigènes O chez les Entérobactéries (Salmonella, Eschérichia, Arizona, Shigella ...). Dans certaines bactéries à gram négatif une couche supplémentaire plus ou moins gélatineuse, la capsule enveloppe toutes ces structures. Les capsules font partie des couches extracellulaires. Elles sont constituées par des substances macromoléculaires, souvent des polysaccharides, eux-mêmes composés par des acides hexuroniques ou des esters phosphates de sucres, mais aussi par des protéines. Ils se distinguent par leur grande capacité de rétention d'eau. La capsule représente pour les bactéries une protection contre les mécanismes de défense des organismes supérieurs (comme la phagocytose par exemple). Les substances qui composent ces capsules induisent dans les organismes supérieurs la formation d'anticorps, c'est pourquoi ils furent appelés antigènes K (K = Kapsel).

II. LES ANTIGENES O DES SALMONELLES

A) Classifications sérologique et chimique

Le genre Salmonella appartient à la famille des Entérobactéries et englobe environ 1000 espèces différentes parmi lesquelles de nombreuses sont pathogènes pour l'homme et pour les animaux. Les Salmonelles sont des bâtonnets flagellés à gram négatif. Elles ne forment pas de spores. White et Kauffamnn (1954,1961) ont utilisé les relations sérologiques et biochimiques existant entre les différentes bactéries du genre Salmonella pour établir une classification connue sous le nom de Schéma de Kauffmann-

White (Kauffmann et al. 1960, 1962a, 1964). Ce schéma donne une base théorique et pratique pour l'établissement de diagnostics et, ce qui est plus important pour nous, il sert de guide dans les études comparatives immunochimiques, biochimiques et génétiques.

La différenciation sérologique repose sur les antigènes qui sont présents à la surface des cellules et provoquent dans les organismes supérieurs la formation d'anticorps. La différence d'un sérogroupe à l'autre repose sur les spécificités différentes de leurs antigènes flagellaires H (thermosensibles) et de leurs antigènes somatiques O ou lipopolysaccharides (thermostables). Les termes antigènes O et H ont une origine historique. Les bactéries flagellées mobiles poussent en formant des voiles à la surface des cultures (Hauch = H) ce qui n'est pas le cas des bactéries sans flagelles (Ohne Hauch = O). Dans ce travail nous ne tiendrons pas compte des flagelles et nous nous concentrerons particulièrement sur les antigènes O (lipopolysaccharides).

Le tableau 1 montre les premiers résultats obtenus après une étude immunochimique de quelques espèces de Salmonella (Kauffmann et Lüderitz). Ce sont les premiers essais de corrélation entre la classification sérologique et la composition chimique des antigènes de surface de ces espèces. Les antigènes somatiques se révèlèrent comme étant des lipopolysaccharides.

Dans ce tableau 1 on reconnait les 14 premiers représentants des groupes A à E du schéma de Kauffmann-White. Chaque lipopolysaccharide dérivé d'une espèce à l'intérieur d'un même groupe, est composé des mêmes sucres. Ceci montre une relation étroite entre le sérotype d'une espèce et le chimiotype de son lipopolysaccharide. Cette relation a pu être mise en évidence par la suite pour les espèces des autres groupes de Salmonelles du schéma de Kauffmann-White.

Tableau 1. Classifications sérologique et chimique de quelques espèces de Salmonelles en sérotypes et chimiotypes

Espèces	Groupe	Facteurs antigéniques	Sucres spécifiques des lipopolysaccharides
S.paratyphi A	A	1,2,12	Mannose,Rhamnose,Paratose
S.paratyphi B	B	4,5,12	Mannose,Rhamnose,Abequose
S.typhi murium		4,5,12	Mannose,Rhamnose,Abequose
S.abortus equi		4,12	Mannose,Rhamnose,Abequose
S.paratyphi C	C	6,7	Mannose
S.cholera suis		6,7	Mannose
S.montevideo		6,7	Mannose
S.typhi	D	1,9,12	Mannose,Rhamnose,Tyvelose
S.enteritidis		1,9,12	Mannose,Rhamnose,Tyvelose
S.sendai		1,9,12	Mannose,Rhamnose,Tyvelose
S.anatum	E	3,10	Mannose,Rhamnose
S.newington		3,15	Mannose,Rhamnose
S.minneapolis		(3),(15),34	Mannose,Rhamnose
S.senftenberg		1,3,19	Mannose,Rhamnose

B) Isolement des lipopolysaccharides

Depuis les travaux classiques de Boivin et al.(1933, 1935), de Morgan et Partridge (1940-1941), de Goebel et al. (1945) ainsi que les nombreux travaux sur les Salmonelles de Westphal et Lüderitz (1952,1954) et de Staub et al. (1956) on sait que l'antigène somatique O est représenté par un complexe lipide-lipopolysaccharide-protéine. Les principales méthodes d'extraction sont résumées dans le tableau 2.

Procédés d'extraction des endotoxines bactériennes

ANNEES	AUTEURS	PROCEDES	BACTERIES
1932	A.Boivin et al.	Acide trichloracétique à froid	Bactéries à Gram négatif
1934	H.Raistrick et W.W.Topley	Digestion trypsique suivie de diverses précipitations	Bactéries à Gram négatif
1937	W.T.J.Morgan et S.M.Partridge	Diéthylène glycol	Shigella dysent. S.typhosa
1939	A.A.Miles et N.W.Pirie	Autolyse en présence de phénol 2% suivie de diverses précipitations	Brucella melitensis
1940	J.W.Palmer et T.D.Gerlough	Phénol liquide à froid suivie d'une extraction à l'eau	Salmonelles et autres bactéries
1940	J.Walker	Urée 2,5 molaire	E.coli, Salmonelles
1945	W.F.Goebel et al.	Pyridine-eau (1:1)	Shig.paradysent. Flexner
1952	Y.Takeda	Acide acétique à froid	S.paratyphi B
1952	R.S.Roberts	Eau à 80-85°C	E.coli
1952	O.Westphal et O.Lüderitz	a) émulsion eau-phénol- à froid	Nombreuses bactéries à Gram négatif et autre matérial
		b) mélange homogène phénol-eau à 60-65°C	
1958	E.Ribi et al.	Ether ou dioxane et eau	Salmonelles
1961	G.J.O'Neill et J.P.Todd	Traitement préalable au TCA suivi par une extraction au phénol-eau	Bactéries à Gram négatif
1965	L.Leive	EDTA	E.coli
1969	C.Galanos et al.	Phénol-chloroforme-éther de pétrole à froid	Salmonelles mutants R

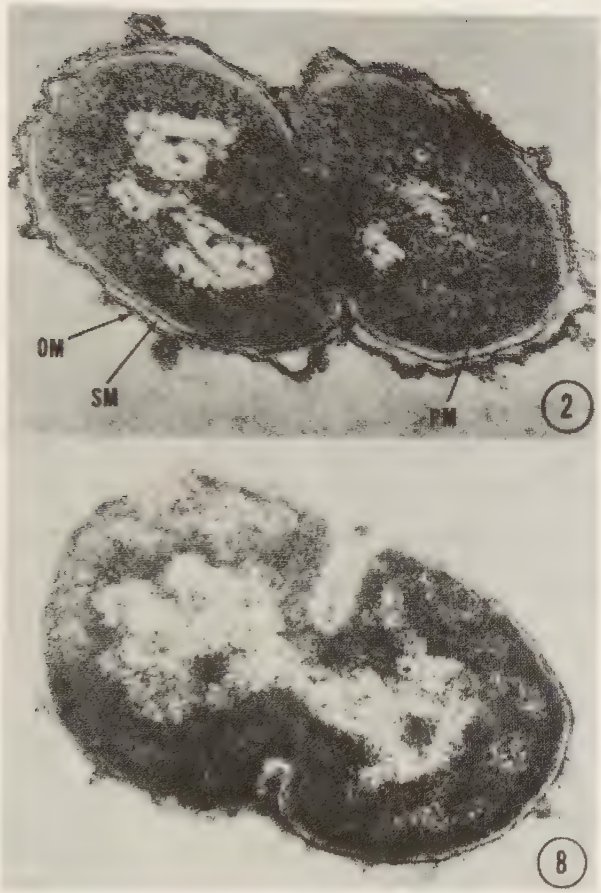


Figure 3 Photographie au microscope électronique (aggrandissement 100 000 fois) de Veillonella avant (2) et après (8) extraction par le mélange phénol:eau (Bladen et Mergenhagen 1964)

OM = paroi; SM = peptidoglycane
PM = membrane cytoplasmique

L'extraction par le mélange homogène phénol-eau (Westphal et Lüderitz 1952, Westphal et Jann 1965) est la méthode communément utilisée dans l'étude des Salmonelles. Elle sera décrite en détails dans le chapitre suivant.

Une étude au microscope électronique par Bladen et Mergenhagen (1964) montre les modifcations observées sur la cellule bactérienne après cette extraction. La paroi est détachée tandis que la membrane cytoplasmique et le peptidoglycane restent intacts. La forme de la bactérie est maintenue. Ceci démontre bien que les complexes antigènes somatiques O sont localisés à la surface de la bactérie (fig. 3).

Suivant la méthode d'extraction on obtient l'antigène complet (Boivin) ou (selon Westphal et Jann 1965) un lipopolysaccharide (lipoide A lié au polysaccharide) détaché du lipide B et de la protéine (voir figure 4).

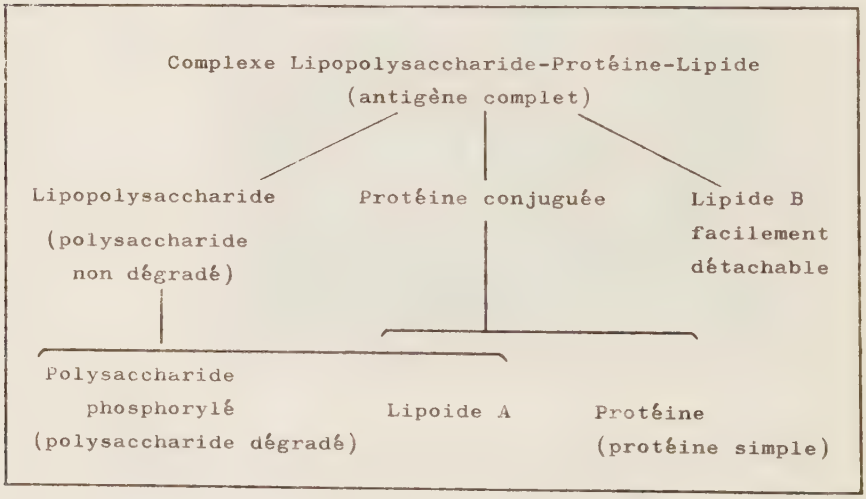


Figure 4 Composants du complexe lipopolysaccharide-protéine-lipide d'après Westphal et Lüderitz (1954)

Une hydrolyse ménagée par l'acide acétique 0,1 N rompt la liaison covalente entre le lipoide A et le polysaccharide (Freeman 1942). On obtient finalement le polysaccharide dégradé de l'antigène O.

C) Propriétés biologiques

La situation exposée des lipopolysaccharides à la surface des bactéries suggère que ces substances macromoléculaires pourraient jouer un rôle dans les rapports cellule bactérienne-organisme récépteur. En fait on peut reproduire de nombreux symptômes d'infection par les Salmonelles en injectant les lipopolysaccharides isolés à partir des bactéries. Parmi les nombreuses activités endotoxiques des lipopolysaccharides, l'effet pyrogène est particulièrement intéressant. La figure 5 montre qu'il apparait chez l'homme une très forte réaction fébrile après une courte phase de latence quand on injecte environ 0,001 µg/kg de lipopolysaccharide. Ces quantités sont comparables chez les animaux de laboratoire (lapin). En même temps il y a une perturbation importante de la formule sanguine: une leucopénie suivie d'une leucocytose prononcée.

Les lipopolysaccharides provoquent encore de nombreuses réactions biologiques comme le phénomène de Shwartzmann, des nécroses de tumeurs, des variations de la pression sanguine, l'inactivation du complément, l'activation de la fibrinolyse, des variations dans la résistance non spécifique aux infections, des effets d'adjuvant etc.. L'application de fortes doses a un effet léthal sur les animaux injectés. Il faut noter ici l'importance de la température ambiante. Une élévation de la température ambiante provoque une sensibilité accrue des animaux vis à vis des lipopolysaccharides. Les derniers résultats obtenus (Rietschel et al. 1971; Galanos et al. 1971) montrent le rôle important joué par le lipoide A dans les effets endotoxiques des lipopolysaccharides. L'importance de ce constituant a été suggérée dès 1954 par Westphal et Lüderitz.

A coté de ces réactions endotoxiques non-spécifiques, ces substances provoquent des effets hautement spécifiques chez les animaux. Les complexes lipopolysaccharide-protéine-lipide représentent les antigènes O des bactéries et stimulent dans l'organisme la production d'anticorps O-spécifiques. Ceux-ci correspondent à des structures bien délimitées de la molécule du lipopolysaccharide avec

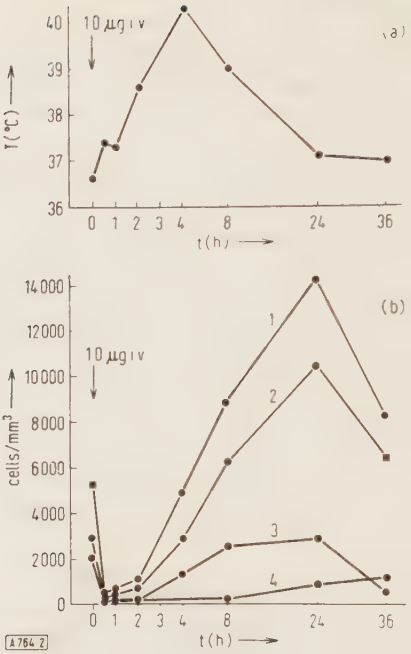


Figure 5

Variations de la température corporelle et de la formule sanguine après injection de 1,0 microgramme de lipopolysaccharide de Salmonelle à l'homme.
1 = Nombre total des leucocytes; 2 = granulocytes; 3 = Stabs; 4 = lymphocytes. (Lüderitz 1970).

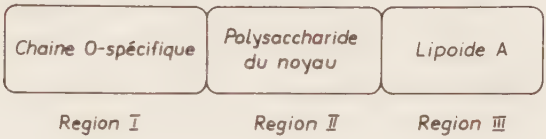
lequel on a immunisé. La partie polysaccharidique (haptène) est porteuse de la spécificité des différents lipopolysaccharides. Par ailleurs les lipopolysaccharides peuvent faire fonction de récepteurs pour un certain nombre de phages (A.A.Lindberg 1967). Cette réaction est aussi très spécifique. La présence ou l'absence d'un seul sucre décide de l'absorption et de l'inactivation du phage.
Les lipopolysaccharides extraits des bactéries à gram négatif (Entérobactéries) représentent une immense classe de substances naturelles. De nombreux groupes de chercheurs ont travaillé sur leur fonction endotoxique. Les

chimistes et les biochimistes se sont attachés à élucider la structure fine de ces lipopolysaccharides dans le but de mettre en évidence les groupements responsables des différentes activités biologiques.

D) Etat des connaissances actuelles sur la structure des lipopolysaccharides

1) Généralités

Les premiers résultats analytiques et biochimiques ont montré que ces lipopolysaccharides sont constitués de manière analogue, selon un schéma qui comprend trois régions principales de structure différente (figure 6).



Représentation schématique des trois éléments constituant les lipopolysaccharides

Figure 6.

Tous les lipopolysaccharides renferment un composant lipidique, le lipoide A (région III) auquel est lié le noyau polysaccharidique (région II). Le noyau ou "core" est identique dans tous les lipopolysaccharides des Salmonelles et très semblable dans sa structure grossière chez les autres Entérobactéries.

Sur ce noyau se greffent les chaines latérales O-spécifiques. C'est cette partie de la molécule qui différencie les lipopolysaccharides des différentes espèces. L'ordonnance, la séquence et les liaisons des sucres sont spécifiques pour chaque lipopolysaccharide. Cette région I porte la spécificité sérologique et conditionne la corrélation établie entre la classifications sérologique (sérotype) et chimique (chimiotype).

Tableau 3 Différents sucres constitutifs et classification en chimiotypes des lipopolysaccharides des Salmonelles (Lüderitz 1970)

Chimiotypes	3-amino-3,6-didesoxyglucose	3-amino-3,6-didesoxygalactose	2-amino-2,6-didesoxyglucose	D-mannosamine	D-galactosamine	D-glucosamine	Acide 2-céto-3-désoxyoctonique	L-glycéro-D-mannoheptose	D-galactose	D-glucose	D-mannose	L-fucose	L-rhamnose	D-ribose	Colitose	Abequose	Paratose	Tyvelose	Sérogroupes
I						•	•	•	•	•									V, X, Y
II					○	•	•	•	•	•									L, P, 51
III						•	•	•	•	•	○								C_1, C_4, 11
IV					○	•	•	•	•	•	○								K, R
V						•	•	•	•	•		○							W
VI					○	•	•	•	•	•		○							G, N, U
VII						•	•	•	•	•			○						59
VIII					○	•	•	•	•	•			○						53, 57
XXV						•	•	•	•	•				○					52
IX					○	•	•	•	•	•				○					56
X						•	•	•	•	•					○				0
XI					○	•	•	•	•	•					○				Z
XII					○	•	•	•	•	•	○	○							I
XIII						•	•	•	•	•	○		○						E, F, 54
XIV						•	•	•	•	•	○		○			○			B, C_2 C_3
XV						•	•	•	•	•	○		○				○		A
XVI						•	•	•	•	•	○		○					○	D_1 D_2
XXXIV				○		•	•	•	•	•									J
XXXV				○		•	•	•	•	•			○						T
XXXVI			○			•	•	•	•	•									58
XXXVII			○			•	•	•	•	•	○								S
XXXVIII		○			○	•	•	•	•	•									55
XXXII	○				○	•	•	•	•	•			○						M(28_1,28_3)
XXXIX	○				○	•	•	•	•	•				○					M(28_1,28_4)
XXXX	○				○	•	•	•	•	•	○	○							Q

2) Structure des chaines O-spécifiques des lipopolysaccharides de Salmonelles

Les principaux sucres identifiés dans les lipopolysaccharides de Salmonelles sont représentés dans le tableau 3. Ce tableau peut se lire de gauche à droite comme un chromatogramme. Par exemple, le chimiotype VI renferme 7 sucres et correspond aux sérogroupes G, N, U. Selon leur degré de complexité les chaines O-spécifiques des lipopolysaccharides de Salmonelles contiennent 5 à 8 (ou 9) sucres différents dans le même polysaccharide. Environ 18 monosaccharides ont pu être identifiés jusqu'à présent; leur présence dans les lipopolysaccharides a permis une classification en deux grands groupes.

Le premier groupe comporte tous les lipopolysaccharides renfermant les 5 sucres de base caractéristiques du noyau polysaccharidique (région II, cercles pleins dans le tableau 3). Dans le second groupe les lipopolysaccharides renferment en plus d'autres sucres présents en diverses combinaisons. Ceux-ci sont spécifiques pour chaque lipopolysaccharide et ont permis la classification en chimiotypes, caractéristiques de ces lipopolysaccharides. Certains sucres furent découverts pour la première fois dans ces lipopolysaccharides. Ce sont les stéréoisomères des 3,6-di-desoxy-hexoses (Westphal et Lüderitz 1960) et les 2- et 3-amino- 6 -desoxy-hexoses (Lüderitz et al. 1968b). Les sucres spécifiques représentent exclusivement les constituants des chaines O-spécifiques. A.M. Staub (Paris), P.W. Robbins (Cambridge U.S) et T. Uchida ont réussi à identifier la structure de chaînes O-spécifiques de certaines espèces de Salmonelles avec des méthodes immunologiques. Les récents résultats de B. Lindberg et al. (Stockholm) sont venus compléter et confirmer leurs travaux.

D'après ces résultats les chaînes latérales O-spécifiques sont constituées par une séquence répétitive d'unités oligosaccharidiques identiques (repeating units) dont la figure 7 montre un exemple. D'autres lipopolysaccharides contiennent des chaines latérales très différentes en ce qui concerne les sucres constitutifs et leurs liaisons.

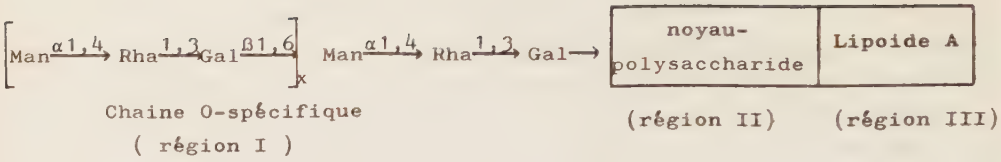


Figure 7 Structure de la chaine O-spécifique du lipopolysaccharide de S. newington (Uchida et al. (1963)

3) Synthèse des chaines O-spécifiques

Les étapes qui se déroulent lors de la synthèse des chaines O-spécifiques sont schématisées (fig. 8) pour le lipopolysaccharide de S. newington (Horecker 1966; Nikaido 1968; Losick et Robbins 1967).

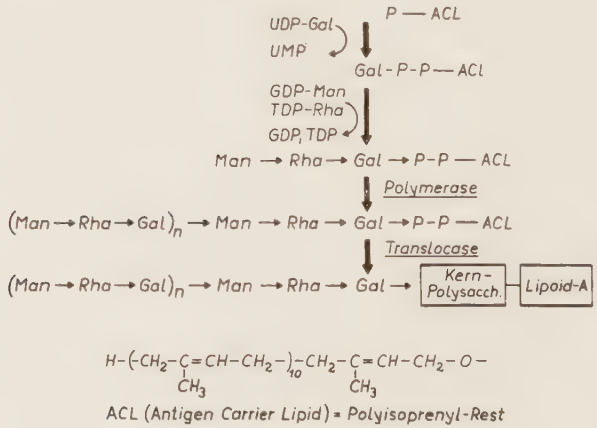


Figure 8 Biosynthèse de la chaine O-spécifique du lipopolysaccharide S. newington (Lüderitz 1970)

Comme l'ont montré Weiner et al.(1965) et Wright et al.(1965) tous les éléments intermédiaires de la synthèse sont reliés à une fraction lipidique par un pont pyrophosphate. Dans une première étape il y a un transfert séquentiel des dérivés nucléotidiques des sucres (précurseurs) par l'intermédiaire des transférases. Il en résulte la formation d'une unité de répétition . Dans une étape suivante ces unités sont polymérisées (polymérase) de telle sorte que la chaîne est rallongée chaque fois d'une unité. La chaîne terminée est finalement transférée par l'intermédiaire d'une translocase sur le noyau polysaccharide et lipoide A préformé. Le lipide transporteur (ACL = antigen carrier lipid) est un dérivé polyisoprénoide en C_{55} (Wright et al. 1965 ; Higashi et al. 1968) semblable à celui identifié dans la synthèse du péptidoglycane.

III. LES ANTIGENES OBTENUS A PARTIR DES MUTANTS DES SALMONELLES

A) Mutants R des Salmonelles

Les termes S (smooth = lisse) et R (rough = rugueux) sont utilisés pour la description morphologique des bactéries (lisse, rugueuse) et pour la classification sérologique (S, R). Par définition des mutants dépourvus de la spécificité O sont désignés comme des formes R par opposition aux formes S dérivant de la souche sauvage de la bactérie considérée.

Dans les cultures vieillissantes de bactéries sauvages on a pu mettre en évidence des colonies rugueuses formées par des mutants. Une différenciation sérologique suivait la différenciation morphologique. On a pu observer la manifestation d'une nouvelle spécificité R consécutive à la disparition de la spécificité O de la souche d'origine.

De nombreux mutants R purent être isolés et étudiés. Ils synthétisent un lipopolysaccharide totalement dépourvu de chaînes O-spécifiques. Celui-ci contient en plus du lipoide A soit tous les sucres du noyau, soit le noyau plus ou moins complet. Par analogie avec les chimiotypes des formes S on a pu classifier les formes R

en chimiotypes Ra, Rb, Rc,... dépendant des sucres de base présents. Ces lipopolysaccharides R sont bloqués à différents échelons de la biosynthèse du noyau central ("core"). La figure 9 résume les connaissances actuelles quant à la structure des régions II ("core") et III (lipoide A).

La structure du lipoide A a été étudiée dans plusieurs laboratoires (Ikawa et al. 1953; Nowotny 1961 et 1963 Kasai 1961, 1964; Burton et Carter 1964; Gmeiner et al. 1969; Rietschel et al. 1971).

La biosynthèse du noyau polysaccharidique et des chaînes O-spécifiques se déroulent suivant des principes fondamentalement différents. On a pu reconstituer les étapes de la biosynthèse du noyau en comparant les structures des lipopolysaccharides dérivés de divers mutants R, La figure 10 montre les étapes successives de cette biosynthèse qui se déroule par addition séquentielle des sucres constitutifs sur la chaîne polysaccharidique en croissance. Jusqu'ici le heptose n'a pas pu être transféré in vitro , car leprécurseur actif de ce sucre n'est pas connu. On sait que pour l'incorporation des sucres du pentasaccharide hexosidique du noyau la présence de heptose-phosphate est nécésaire (Mühlradt et al. 1968). M.J. Osborn et al.(1964) a réussi à synthétiser in vitro un lipopolysaccharide Ra à partir d'un lipopolysaccharide RdP^+ (S. typhi murium) par incorporations successives des dérivés nucléotidiques des sucres suivants : glucose, galactose,N-acétyl-glucosamine. Une synthèse analogue a été réussie à partir des lipopolysaccharides incomplets de S.minnesota et de S. ruiru (Risse et al. 1967).

S'il existe une mutation intermédiaire entre RcP^+ et Rb , elle n'a pas encore été isolée.

Les mutants R sont immunogènes et provoquent la formation d'anticorps R-spécifiques. Les sucres terminaux non-réducteurs deviennent dans ce cas immunodominants. Les lipopolysaccharides R sont aussi les récepteurs d'une série de phages comme le phage Felix 01 pour le mutant Ra par exemple Les formes R ne sont pas pathogènes bien que leurs lipopolysaccharides soient aussi toxiques que celui des formes S .

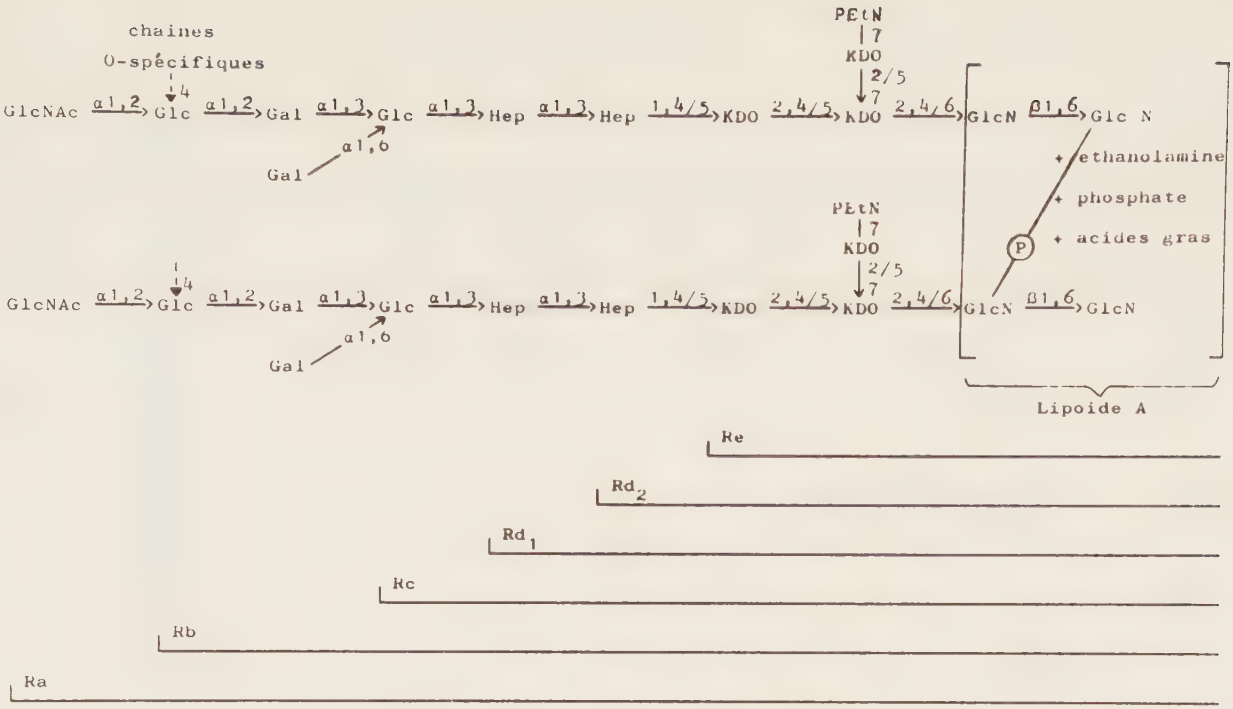


Figure 9. Structure proposée pour les différents lipopolysaccharides R.

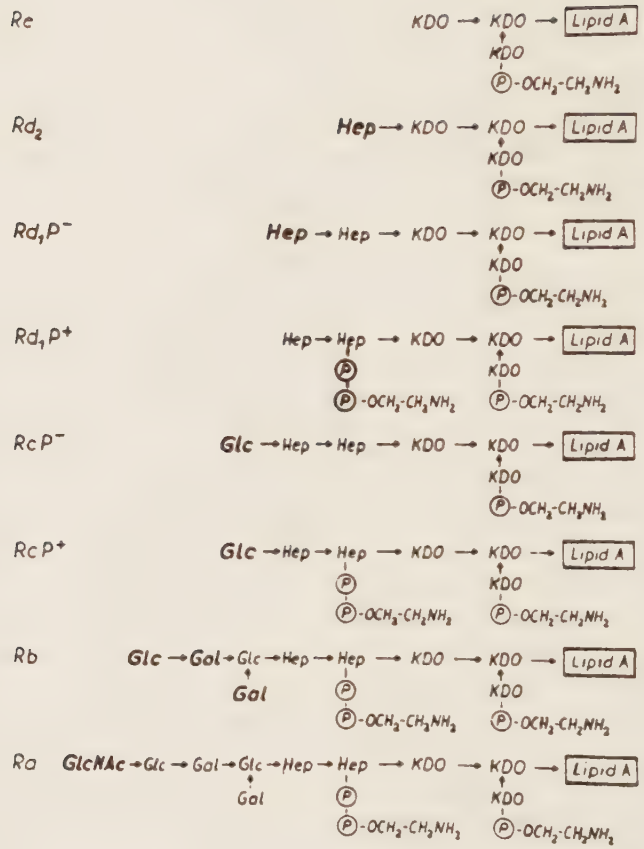


Figure 10. Biosynthèse du polysaccharide du noyau polysaccharidique des Salmonelles et structure des différents mutants R connus.(Lüderitz 1970).

Ceci s'explique par le fait que les formes rugueuses sont facilement phagocytées tandis que les formes lisses sont protégées par les longues chaînes de leurs antigènes O.

B) Mutants S-R

Cette classe de mutants a été appelée S-R (semi-rough) parce qu'elle a des propriétés intermédiaires entre les formes S et R. Certaines mutations portent sur la polymérase (figure 8) ce qui bloque , par conséquent, la polymérisation des unités de répétition. Les lipopolysaccharides ne portent qu'une seule unité oligosaccharidique fixée sur le noyau polysaccharidique ("core").

C) Mutants T1

Deux nouveaux types de Salmonelles furent isolés pour la première fois dans plusieurs cliniques d'Europe. Ils ne purent être identifiés par aucun des sera anti O connus jusque là. Kauffmann qui reçut les souches pour les classifier hésita à créer un nouveau groupe de Salmonelles. Par leurs antigènes flagellaires et leurs propriétés biochimiques (fermentations) elles semblaient dérivées de S. paratyphi B et de S. typhi murium .La spécificité O a été , dans ce cas remplacée par une spécificité nouvelle , différente de toutes les spécificités O et R connues. Kauffmann (1956) proposa de les nommer formes T1 (transitoires). Quand on cultive ces bactéries elles donnent des colonies lisses, non-agglutinables dans le chlorure de sodium 0,85%. Elles sont toujours contaminées par des colonies rugueuses parce qu'elles ont tendance à donner par reversion des formes R, d'où leur dénomination : formes T1 , transitoires.

Les formes T1 et S ne peuvent être différenciées que par les sera anti T1 ou anti O. Récemment J. Schlosshrdt (1950, 1964) a réussi à provoquer cette mutation dans son laboratoire. Elle a montré que beaucoup (pratiquement toutes les espèces) de Salmonelles pouvaient , par mutation, passer par la forme T1 . Pourtant ces mutants furent rarement isolés à partir de sources naturelles. On pense actuellement qu'en principe toutes les Salmonelles peuvent subir une mutation vers la forme T1.

C'est un phénomène intéressant que les diverses espèces de Salmonelles, différenciées par leur spécificité et par leur structure antigénique (antigènes O), puissent muter pour donner une forme commune contenant un antigène similaire , l'antigène T1. Il est étonnant que l'on ne connaisse pas jusqu'ici la signification qu'a pour la bactérie cette capacité de muter dans une forme T1 commune. Une étude génétique de M. Sarvas (1967) a montré qu'un gène ou un groupe de gènes situés sur le chromosome au voisinage du locus gal (figure 11) est nécessaire à la mutation d'une souche de type sauvage en forme T1. Ce gène appelé rft1 est généralement inactif et seule une mutation peut le réactiver.

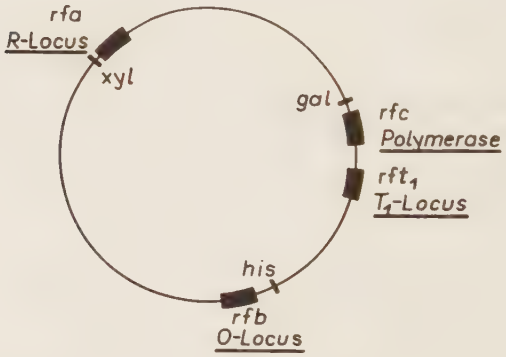


Figure 11. Carte chromosomique de S. typhi murium avec la localisation des gènes responsables de la synthèse des différents lipopolysaccharides.

Il en résulte la synthèse d'un antigène T1. Pourtant on a pu montrer (Sarvas et al.1967) que la seule réactivation du gène rft1 ne donne pas une forme T1 mais une souche contenant en même temps la spécificité T1 et la spécificité O. Les antigènes isolés à partir des tels mutants O,T1

contiennent les sucres O-spécifiques de la souche d'origine et les sucres T1-spécifiques du mutant T1. C'est pourquoi il est admis que pour l'apparition de la mutation T1 , deux mutations sont nécessaires : elles concernent d'une part le locus rfb qui doit bloquer la synthèse des chaînes O spécifiques, et d'autre part, la réactivation du locus rft1. Il résulte de cette double mutation la formation de vrais mutants T1 comme le montre la figure 12 suivante.

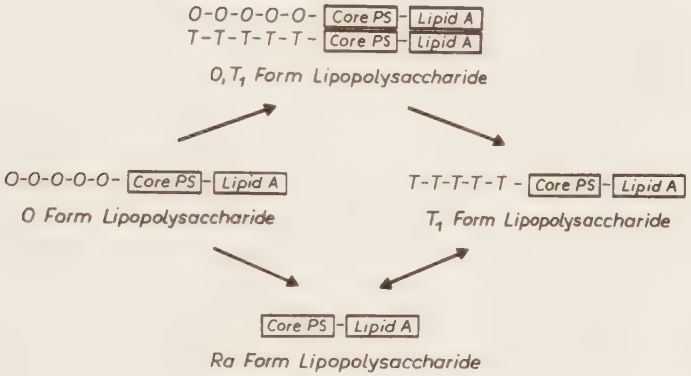


Figure 12. Etapes de la mutation qui mènent du type sauvage à un mutant T1.

A la suite de ces résultats et de ceux d'autres expériences de recombinaison , nous avons émis l'hypothèse que dans les mutants T1 les chaînes O-spécifiques sont remplacées par des chaînes T1-spécifiques et que ces chaînes sont reliées au polysaccharide du "core" de la même manière que les chaînes O-spécifiques. Par conséquent dans les souches O,T1 le "core" sera porteur soit de chaînes T1 soit de chaînes O.Dans ce cas celles-ci entrent en compétition pour les points d'attache sur le "core". Par analogie nous

avons supposé que les chaînes T1-spécifiques seraient composées d'unités oligosaccharidiques de répétition.

Chimiquement tous les mutants T1 se sont montrés très similaires. On a pu extraire un lipopolysaccharide qui réagit sérologiquement avec les séra anti T1 et qui représente par conséquent l'antigène T1. On a montré que les antigènes T1 contiennent tous les sucres du "core". Ils comportent en plus de grandes quantités de ribose et de galactose qui se révèlent comme étant les sucres spécifiques de l'antigène T1.

Les mutants T1 et leurs lipopolysaccharides représentent une classe unique dans les systèmes naturels. Il est intéressant pour les bactériologistes d'étudier leur signification physiologique. Il est possible qu'ils jouent un rôle lors de l'infection et dans la pathogénicité.

On ne sait rien sur la signification biologique des mutants T1 dans la nature. Mais il semble peu probable que les espèces des Salmonelles possèdent un gène rft1 qui n'entrerait jamais ou seulement rarement en fonction. De nombreux groupes de travail se penchent sur ce problème.

L'étude de la virulence des formes T1 a montré qu'en général si la forme S d'origine est virulente, la forme T1 qui en dérive aura une virulence atténuée. Elle provoque une réaction intermédiaire entre les formes S et R apparentées, (Ruschmann, et Lüderitz 1970) . Les souches T1 que Kauffmann avait reconnues comme dérivant de S.paratyphi B et S.typhi murium étaient pathogènes puisqu'elles ont été isolées chez des malades. Il semble que l'échange de la spécificité O pour la spécificité T1 chez les bactéries provoque une nette diminution de la virulence. Certaines souches T1 comme S,typhi murium T1 montrent une virulence atténuée chez la souris mais non négligeable. D'autres comme S.friedenau T1 dont la forme sauvage est peu virulente se montrent avirulente sous leur forme T1 (Ruschmann ; Mäkelä communication personelle). Les lipopolysaccharides isolés sont néanmoins toujours toxiques comme tous les lipopolysaccharides S et R.

Kauffmann (1957) isola à partir de S. bareilley un nouveau mutant , différent du mutant T1 qu'il appela T2. De la même manière on a pu extraire un lipopolysaccharide spécifique de la forme T2.

Dans ce travail nous avons étudié la structure chimique de l'antigène somatique (ou lipopolysaccharide) du mutant T1 dérivé des Salmonelles. Notre étude a porté principalement sur le lipopolysaccharide de S. friedenau T1.

PLAN DE TRAVAIL

Nous avons divisé ce travail en quatre chapitres suivis d'une conclusion.

Le premier chapitre traitera de la préparation du matériel et des techniques utilisées pour l'étude chimique et immunologique des lipopolysaccharides T1.

Le deuxième chapitre traitera des premiers résultats de l'étude chimique et sérologique du lipopolysaccharide de S.friedenau T1.

Le troisième chapitre traitera de l'analyse et de la détermination par chromatographie en phase gazeuse des liaisons des sucres dans le lipopolysaccharide de S. friedenau T1.

Le quatrième chapitre traitera de la structure des chaînes polysaccharidiques T1.

Les chapitres II, III, IV présentent les résultats dans l'ordre chronologique de nos recherches. Les chapitres II et III ont parus sous forme de publications :

- Wheat R.W., M.Berst, E. Ruschmann, O. Lüderitz et O. Westphal . Journal of Bacteriology, 94, 1366, (1967)
- Berst M., C.G. Hellerqvist, B. Lindberg, O. Lüderitz, S. Svenson et O. Westphal ; European Journal of Biochemistry; 11, 353, (1969).

Le chapitre IV est actuellement sous presse :

- Berst M. et Lüderitz O. , European Journal of Biochemistry.

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

I. PREPARATION ET DEGRADATION DU LIPOPOLYSACCHARIDE T1

A) Obtention des germes

La souche du germe S.friedenau T1 a été isolée par J. Schlosshardt (Zentral Laboratorium für bakterielle Darminfektion, Berlin-Pankow, DDR). Les bactéries sont cultivées à 37° en "batch" culture dans un fermenteur (Schlecht et al. 1968) contenant 14 litres de milieu agité (environ 650 T.p.m.) et aéré (1,5 litre d'air par minute, par litre de culture). Le pH est réglé à 7,2 par addition de soude 2N et d'acide chlorhydrique 2N. Le milieu de culture contient par litre:

15 g de caséine peptone digérée par la trypsine
5 g d'extrait de levure Difco
3 g d chlorure de sodium
8 g de phosphate disodique (Na_2HPO_4, 12 H_2O)
1 % de glucose
0,02 % de $MgSO_4$, 7 H_2O
0,3 ml de produit antimoussant (P2000)
0,9 ml d'huile de tournesol

La culture est arrêtée au niveau de la phase stationnaire de croissance par addition de 14 ml d'une solution de phénol à 90% au milieu de culture. Les germes sont récoltés par centrifugation du milieu, puis lavés une fois à l'eau distillée.

B) Préparation des parois bactériennes (Hellerqvist et al. 1968)

Les bactéries humides non lavées (7,5 g) sont mises en suspension dans 30 ml d'eau distillée, puis désintégrées en présence de perles de verre (30 g; 0,17-0,18 mm de diamètre) dans un désintégrateur Braun (B.Braun Apparatenbau, Melsungen, BRD) pendant 3 minutes à vitesse maximum. La température est maintenue en dessous de 5°C par un courant de gaz carbonique liquide. Les perles de verre sont éliminées par filtration sur laine de verre. Les parois sont séparées des débris cellulaires par centrifugation à 10.000 g pendant 20 minutes dans une cen-

trifugeuse Sorval à 4°C. Les parois se retrouvent dans une couche très légèrement tassée à la surface du sédiment. Elles sont remises en suspension dans de l'eau distillée en prenant soin de ne pas entrainer les débris cellulaires collés au fond du tube à centrifuger. La préparation est lavée à 4°C, deux fois avec du tampon phosphate 0,1M (pH 7), une fois avec du chlorure de sodium 1M et finalement avec de l'eau distillée. Le rendement est d'environ 10% par rapport au poids sec des bactéries.

C) Extraction selon la méthode de Westphal et Jann (1965)

Le lipopolysaccharide est préparé soit à partir des bactéries entières lavées et lyophilisées, soit à partir des parois bactériennes.

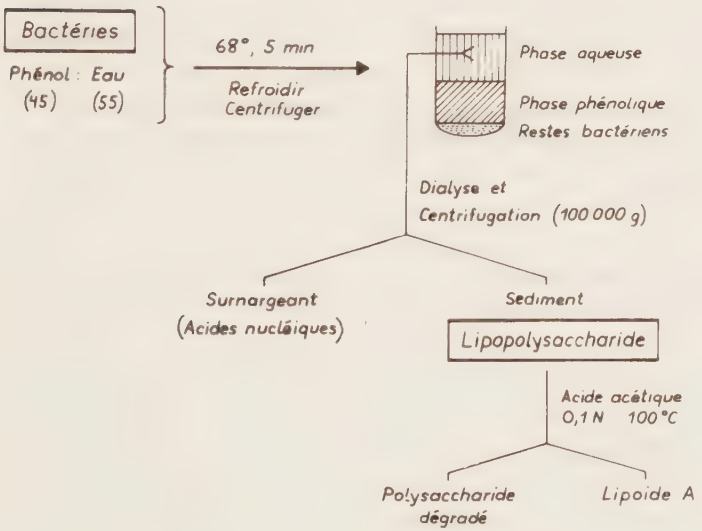


Figure I,1 Représentation schématique de l'extraction du lipopolysaccharide à partir des corps bactériens par le mélange phénol:eau. (Westphal et Jann 1965)

La préparation du lipopolysaccharide comporte: une extraction par le mélange homogène phénol:eau (45:55, en volumes) à 68° pendant 5 minutes. Ce traitement dissocie le complexe protéine-lipoide-lipopolysaccharide de la paroi. Le milieu refroidi et centrifugé permet de séparer une phase aqueuse d'une phase phénolique. Au fond se retrouvent les débris cellulaires. La phase aqueuse renferme le lipopolysaccharide, des polysaccharides et les acides nucléiques; la phase phénolique contient des protéines et des lipoides. Cette extraction est répétée une fois. Les phases aqueuses sont réunies et dialysées en présence de toluène contre de l'eau distillée pendant 3 jours. Après concentration et centrifugation à 100 000 g dans une centrifugeuse Spinco L 2, on isole un sédiment contenant le lipopolysaccharide et un surnageant renfermant les fractions légères (L 1) (haptène, glucanes et polysaccharides divers) et les acides nucléiques. Le sédiment est redissous dans de l'eau distillée et recentrifugé; après la troisième centrifugation on obtient un lipopolysaccharide à peu près débarassé des acides nucléiques. Il donne une solution opalescente dans l'eau distillée. Dans le cas des parois bactériennes, la purification par centrifugation n'est pas nécéssaire. Le rendement est d'environ 20% de lipopolysaccharide dans le cas des parois (poids sec) et de 2 à 3% dans le cas des bactéries entières (poids sec).

D) Extraction des germes selon la méthode de Galanos et al. (1969).

La méthode classique d'extraction au mélange phénol: eau donne un mauvais rendement pour les lipopolysaccharides des mutants R. C'est pourquoi une nouvelle méthode a été mise au point par Galanos et al. (1969); elle a été utilisée dans le cas des mutants T1 en vue de détécter une éventuelle contamination par des mutants R dans les cultures T1.

50 g de bactéries sèches sont mises en suspension dans une solution contenant du phénol (90 g de phénol plus 11 ml d'eau distillée), du chloroforme et de l'éther de pétrole dans les proportions suivantes 2:5:8 (en

volumes). La suspension est homogénisée pendant deux minutes à l'aide d'un ultraturax (Firme Janke et Kunkel) en maintenant la température entre 5°C et 20°C. Les bactéries sont éliminées par centrifugation (5000 t.p.m. 15 minutes). L'extraction est répétées deux fois. Les surnageants contenant le lipopolysaccharide sont réunis et filtrés. Le chloroforme et l'éther de pétrole sont évaporés dans un évaporateur rotatif. De l'eau distillée est ajoutée goutte à goutte à la solution phénolique jusqu'à précipitation du lipopolysaccharide. L'addition d'eau est arrêtée quand le lipopolysaccharide commence à floculer. Le lipopolysaccharide est centrifugé à 3000 t.p.m.pendant 10 minutes, lavé trois fois par du phénol à 80% et à l'éther, dissout dans 50 ml d'eau distillée et centrifugé à 100,000 g (4 heures). Le sédiment est redissout dans l'eau et lyophilisé. Le résidu bactérien peut être extrait à nouveau selon la méthode de Westphal et Jann au mélange phénol:eau (lipopolysaccharides des formes S et T1).

E) Traitement alcalin du lipopolysaccharide (Wheat et al. 1967)

Le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 (26,5 mg) en solution dans 1 ml d'eau distillée, est dilué par 1 ml de soude 0,5N et incubé à 56°C pendant 60 minutes. Les précipités sont éliminés par centrifugation. Le surnageant est ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique et le polysaccharide précipité par addition de 4 volumes d'alcool éthylique absolu. Le précipité est lavé à l'alcool éthylique, à l'acétone et à l'éther, et séché . Le rendement par rapport au lipopolysaccharide de départ est de 73%.

Dans une autre expérience le lipopolysaccharide T1 est incubé en présence de soude 0,3 N pendant 18 heures à 37°C. Ces conditions ont été suggérées pour la digestion complète des acides nucléiques (Volkin et Cohn 1954). Les particules insolubles sont éliminées et la préparation dialysée contre de l'eau distillée puis précipitée par l'éthanol à 80% (rendement en polysaccharide : 72%).

F) Hydrolyse acétique du lipopolysaccharide T1 et préparation du polysaccharide T1 dégradé (Berst et al. 1969)

Le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 (3 g) est chauffé à 100°C pendant 2 heures en présence d'acide acétique à 1% (300 ml). Le précipité (lipoide) est centrifugé, lavé à l'acide acétique 1% et séché. Le surnageant, renfermant le polysaccharide est concentré, précipité par l'addition de 4 volumes d'éthanol absolu, centrifugé, lavé par l'éthanol, l'acétone et l'éther. Le rendement en polysaccharide sec est de 50%. Environ 16% de produit non précipitable reste dans le surnageant alcoolique.

G) Purification du polysaccharide T1 dégradé par filtration sur gel Sephadex G 200 (Berst et al. 1969)

Le polysaccharide dégradé (1 g) dissous dans l'eau distillée, est fractionné sur une colonne de Sephadex G200 (2 x 60 cm), l'eau distillée servant de solvant. Des fractions de 4 ml sont récoltées et analysées colorimétriquement par dosage à l'orcinol-chlorhydrique (pentoses) et à la cystéine-sulfurique (méthode de Dische remaniée par Osborn en 1963 pour le dosage des heptoses). Les résultats se trouvent dans le chapitre III.

II. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

A) Préparation des immunséra

Les antiséra contre le mutant R II de S.inverness et le mutant Rb de S.minnesota ont été donnés par F.Kauffmann. Pour préparer le sérum anti S.minnesota R60 et anti S.friedenau T1 des injections intraveineuses sont faites à des lapins selon le schéma suivant (Ruschmann et al. 1962):

1. jour	0,1 ml	de la suspension bactérienne
4. jour	0,2 ml	"
7. jour	0,4 ml	"
10. jour	0,8 ml	"

Six jours après la dernière injection les lapins sont saignés par ponction cardiaque. Le même jour le sérum est séparé de son caillot, maintenu une nuit à 4°C puis purifié une dernière fois avant d'être stocké entre -15°C et -20°C.

Pour l'immunisation on a utilisé des bactéries ayant poussé 24 heures sur boîtes de Roux. Elles ont été mises en suspension dans du chlorure de sodium 0,85%, chauffées pendant 2 heures à 100°C et lavées trois fois avec NaCl 0,85%. La concentration de la suspension a été amenée à 4×10^{10} cellules par millilitre.

B) Courbes de précipitation quantitative et d'inhibition de la précipitation (Lüderitz et al. 1965)

Cette téchnique permet le dosage des précipitines dans un sérum et la comparaison de plusieurs extraits microbiens possédant des propriétés antigéniques. A des quantités constantes d'antisérum (10 µl) on ajoute des quantités croissantes de (lipo)polysaccharide (1 à 100 µg) dissous dans une solution physiologique. On complète à volume constant (300 µl) par NaCl 0,9%. Après agitation, les tubes sont laissés à 4°C pendant 48 heures, puis centrifugés à 6000 tours par minute . Les précipités sont lavés trois fois par la solution physiologique à 4°C. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Lowry et al. (1951). Les précipités sont dissous dans 800 µl de réactif de Folin (contenant NaOH, Na_2CO_3, tartrate de sodium et de cuivre). De cette solution 100 µl sont prélevés pour le dosage du ribose (composant typique du lipopolysaccharide T1) par la méthode de Brown (1946). Au restant de la solution on ajoute le réactif au phénol de Folin pour le dosage des protéines (Lowry et al. 1951); la sérum albumine bovine est utilisé comme protéine de référence. Dans une série supplémentaire de dosages on recherche le galactose (composant typique du lipopolysaccharide T1) dans les précipités par la méthode à la cystéine-sulfurique de Dische et al. (1949). La quantité de protéines dosée correspond aux anticorps présents dans le précipité puisqu'on opère avec des lipopolysaccharides

dépourvus de protéines. On trace la courbe donnant les variations de la quantité de protéines précipitées en fonction de la concentration en antigène. Cette quantité de protéine augmente avec la concentration en antigène jusqu'à une valeur pour laquelle les anticorps sont combinés à toutes les molécules d'antigènes (zone d'équivalence). Au de là de cette valeur la présence d'antigènes en excès provoque la solubilisation de certains complexes et la diminution des protéines précipitées.

Dans les tests d'inhibition de la précipitation si on met en contact un polysaccharide (non précipitable) responsable de la spécificité T1 et l'antisérum correspondant dirigé contre le facteur T1, les glucides terminaux vont occuper sur la molécule d'anticorps les sites spécifiques correspondant à ce facteur. Le sérum précipitera d'autant moins d'antigène que le nombre de sites spécifiques occupés par l'inhibiteur sera plus grand. Dans cet essai les polysaccharides T1 dégradés non précipitables ou le sucre inhibiteur sont incubés pendant une heure à 37°C avec l'antisérum avant l'addition de l'antigène. Les précipités sont analysés comme il a été décrit plus haut.

C) Inhibition de l'hémagglutination selon Beckmann et al. (1964a)

1) Matériel

Les érythrocytes de sang humain sont lavés trois fois avec une solution de NaCl 0,85%. Pour fixer les lipopolysaccharides sur la surface des érythrocytes il faut au préalable les traiter par la soude (page 31). On dissout alors 1 mg de lipopolysaccharide traité aux alcalis dans 1 ml de NaCl 0,85%. A 0,1 ml de cette solution on ajoute 5 ml de NaCl 0,85 % et on laisse incuber 30 à 60 minutes à 37°C en présence de 0,025 ml de la suspension des érythrocytes (sédiment après centrifugation du sang à 3 000 t.p.m). Le lipopolysaccharide non fixé est éliminé après trois lavages avec une solution de NaCl 0,85%. Les érythrocytes ainsi sensibilisés sont mis en suspension dans 5 ml de NaCl 0,85%.

2) Méthode

Pour chaque système hémagglutinant il faut rechercher les proportions appropriées, celles-ci sont alors maintenues constantes: Le lipopolysaccharide inhibiteur n'est pas traité aux alcalis; il est dissous dans une solution de NaCl 0,85% (1 mg/ml). On fait une série de dilutions de la solution inhibitrice avec NaCl 0,85%. A chaque dilution (50 µl) on ajoute le sérum (50 µl) dilué à deux ou quatre fois la concentration hémagglutinante minimale. La dilution du sérum est choisie de telle sorte que la hémagglutination se produise sans qu'une addition supplémentaire de l'inhibiteur soit nécessaire. Après agitation, le mélange est incubé 60 minutes à 37°C, mis en contact avec 100 µl de la suspension d'érythrocytes sensibilisés et réincubés à 37°C. On laisse reposer à 4°C et on recherche au microscope l'échantillon dans lequel l'hémagglutination est entièrement inhibée. L'activité inhibitrice d'une substance est donnée par la concentration minimale (µg/ml) qui inhibe le système hémagglutinant totalement.

D) Test de précipitation dans l'agar (Ouchterlony)

Les tests de diffusion dans l'agar ont été réalisés suivant la téchnique décrite par Ouchterlony (1948, 1949 et 1958) avec quelques modifications. L'agarose (0,9 g) est dissous dans 60 ml d'eau distillée au bain-marie à 100° puis amené à 90 ml avec un tampon à pH 8,6-8,7 (1,66 g d'acide diéthylbarbiturique et 10,51 g de diéthylbarbiturate de sodium sont dissous à chaud dans 200 ml d'eau distillée puis complétés à 900 ml; après addition de 1,53 g de lactate de calcium et 0,200 g d'azide de sodium, la solution est completée à 1000 ml). La solution d'agarose (11 ml) est étalée sur une lame porte-objet, laissée 10 minutes à température ambiante puis une heure à 4°C dans une chambre humide. Les trous dans l'agarose solidifié sont pratiqués à l'aide d'une poinçonneuse LKB. Le sérum et l'antigène sont versés goutte à goutte dans les trous et incubés environ 16 heures à 37°C.

III. TECHNIQUES CHIMIQUES UTILISEES POUR L'ANALYSE DU LIPOPOLYSACCHARIDE T1

A) Hydrolyse du lipopolysaccharide T1

En vue d'une étude quantitative des hexoses par des enzymes spécifiques des échantillons de lipopolysaccharide T1 sont hydrolysés à 100°C en tubes scellés pendant 4 heures dans une solution 1 N d'acide sulfurique. Puis on ajoute trois volumes d'eau distillée et on neutralise le contenu des ampoules en le mettant en contact avec une résine échangeuse d'ions (Amberlite IRA 410 carbonatée). Pour une étude qualitative (chromatographie sur papier ou en couche mince) on ajoute du carbonate de baryum jusqu'à neutralité.

Dans le cas d'un dosage par chromatographie en phase gazeuse des sucres acétylés du lipopolysaccharide T1, on fait une étude cinétique de la libération et de la destruction partielle des pentoses, des hexoses, et des heptoses pendant une hydrolyse à 100°C avec l'acide sulfurique 0,5N. Après une heure tout le ribose est libéré mais seulement environ 28 % des hexoses et 20% du heptose. Après 12 heures dans les mêmes conditions glucose, galactose et heptose sont hydrolysés quantitativement tandis que 30% du ribose sont détruits. C'est pourquoi nous avons dans ce cas adopté deux temps d'hydrolyse différents: 1 ou 12 heures à 100°C en présence d'acide sulfurique 0,5 N.

B) Méthodes analytiques et dosages

1) Dosage du glucose par la glucose oxydase

Cette méthode repose sur l'oxydation spécifique du glucose par la glucose oxydase et la détermination quantitative de peroxyde d'hydrogène formé en présence d'un chromogène accepteur d'oxygène approprié. Nous avons utilisé les solutions de la firme C.F.Boehringer de Mannheim.

2) Dosage du galactose par la galactose oxydase (Fischer et Zapf 1964)

Dans cette réaction le D-galactose est oxydé en position C6 et donne un dialdéhyde. Le peroxyde d'hydrogène formé donne avec l'orthocrésol, en présence de peroxydase,

un composé coloré jaune (maximum d'absorbance à 410 nm).

3) Dosage des hexosamines totaux

Pour la libération des hexosamines une hydrolyse de 4 heures en présence d'acide sulfurique 1 N ne suffit pas. La liaison hexosaminique présente une très grande stabilité à l'hydrolyse et il faut faire appel à l'acide chlorhydrique 4N à 100°C pendant 10 heures. Dans ces conditions les hexosamines sont libérés mais cela ne rime plus à rien de doser quantitativement les hexoses et les pentoses, en grande partie dégradés. Les échantillons sont séchés sous vide, en présence de pastilles de soude. Après addition de bicarbonate de sodium, les échantillons sont N-acétylés par l'anhydride acétique (Roseman et Daffner 1956) suivant la méthode de Morgan-Elson remaniée par Strominger et al. (1959). Le chromogène formé après chauffage à 100°C en présence de borate donne une coloration rouge violacée après addition de para-di-méthyl-amino-benzaldéhyde (absorbance maximale à 585 nm). La D-glucosamine a également été dosée par méthode enzymatique (Lüderitz et al. 1964).

4) Dosage des hexoses totaux

On utilise la méthode à l'anthrone - sulfurique de Dreywood (1946) modifiée par Shields et Burnett (1960). L'anthrone (9,10-dihydro-9,oxoanthracène) donne avec des préparations contenant des hexoses, en milieu sulfurique et à chaud, une coloration bleu-verdâtre. Une hydrolyse n'est pas nécessaire. La réaction est due à la condensation de l'anthranol avec les dérivés du furfural produits par l'action de l'acide sulfurique sur les oses. Pour les hexoses le maximum d'absorbance se situe à 620 nm.

5) Dosage des heptoses d'après la méthode de Dische remaniée par Osborn (1963)

Quand on chauffe les échantillons (non-hydrolysés) en présence d'acide sulfurique concentré les sucres forment un furfural ou un composé homologue qui en combinaison avec la cystéine donne une absorption caractéristique.

Les pentoses en trop grande quantité interfèrent avec les heptoses. Cet inconvénient peut s'éliminer quand on mesure la différence des absorbances entre 505 nm et 545 nm qui est nulle dans le cas des hexoses et des pentoses, et positive pour les heptoses.

6) Dosage des pentoses d'après Brown (1946)

Les pentoses présents dans une préparation (non-hydrolysée) sont déterminés par mesure de la réaction colorée qu'ils donnent avec l'orcinol-chlorhydrique selon la méthode de Bial modifiée par Brown (1946). On peut ignorer une éventuelle interférence due à la présence d'autres sucres quand on mesure la différence d'absorbance entre 665 nm et 550 nm. Seule la présence d'acides uroniques qui donnent un maximum analogue pourrait être gênante dans ce cas (voir figure I,2).

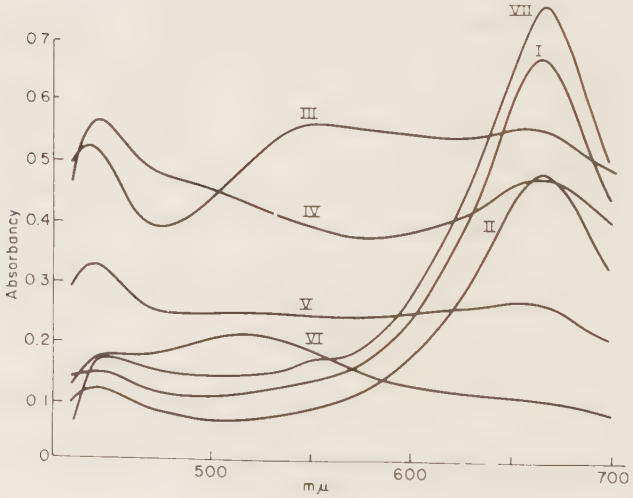


Figure I,2 Spectres obtenus avec divers carbohydrates après traitement selon la méthodes de Brown (1946) à l'orcinol-chlorhydrique. (I) Ribose 0,028 μmoles spectres presque identiques pour les xylose, arabinose et lyxose. (II) Acide galacturonique 0,02 μmoles. (III) D-glycéro-L-mannoheptose 0,098 μmoles. (IV) Méthyl ester de l'acide penta-acétyl-2-céto-3-desoxy-octonique 0,12 μmoles (une courbe similaire a été obtenue avec l'acide libre). (V) Galactose 0,085 μmoles. (VI) Glucose 0,098 μmoles. (VII) Lipopolysaccharide de S.friedenau T1 (24 μgrammes.)

7) Dosage de l'acide 2-céto-3-désoxy-octonique (KDO) selon Ghalambor et al. (1966)

Waravdekar et Saslaw (1959) rapportent une réaction colorée très sensible pour le 2-désoxy-ribose qui est oxydé en dialdéhyde malonique par le périodate de sodium et forme avec l'acide thiobarbiturique un composé à absorbance caractéristique. D'après Weissbach et Hurwitz (1959) cette réaction est utilisable aussi dans le cas de sucres contenant le groupe 2-céto-3-désoxy- qui est oxydé en acide formyl pyruvique. Ces deux produits de dégradation donnent avec l'acide thiobarbiturique des colorations violettes qui absorbent à des longueurs d'onde différentes. Pour le dosage du KDO on mesure la différence d'absorbance entre 532 nm et 560 nm.

8) Dosage des acides uroniques

Ils sont dosés par la méthode au carbazole selon la méthode de Dische remaniée par Ashwell (1957).

9) Dosage du formaldéhyde

Le formaldéhyde, formé après oxydation périodique, est dosé par le réactif à l'acide chromotropique selon la description de Dyer (1956).

10) Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par le réactif de Folin selon Lowry et al.(1951).

11) Dosage du phosphore

Le phosphore est dosé par la méthode de Lowry et al. (1954).

12) Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont déterminés par la mesure de leur absorbance à 260 nm, l'acide ribonucléique de levure est utilisé comme produit de référence.

13) Dosage des acides gras totaux

10 mg de lipopolysaccharide sont saponifiés (NaOH

4N, 5 heures à 100°C). Les acides gras libres sont extraits par le chloroforme après acidification; l'extrait est ensuite évaporé à sec et pesé.

C) Chromatographie sur papier et en couche mince de cellulose

Les sucres sont identifiés par chromatographie descendante sur papier (Watman No. 1 et No. 4) et par chromatographie en couche mince de cellulose (cellulose MN 300 g Macherrey et Nagel, Düren, RFA) dans les systèmes de solvants suivants:

A. butanol-pyridine-eau (6:4:3, en volumes)
B. butanol-pyridine-eau (6:6:5, en volumes)
C. butanol-acide acétique glacial-eau (5:1:2, en volumes)
D. acétate d'éthyle-pyridine-eau (8:2:1, en volumes)
E. acétate d'éthyle-acide acétique-pyridine-eau (5:5:1:3, en volumes) comme phase liquide et acétate d'éthyle-pyridine-eau (40:11:6, en volumes) pour saturer l'atmosphère. Ce dernier système est utilisé seulement pour la chromatographie en couche mince. (Fischer et Dörfel 1955)

D) Chromatographie sur colonne

Les fractionnements sur colonne ont été faits à l'aide de gels de dextrane Sephadex. Les produits obtenus après dégradation selon Smith (Goldstein et al. 1965) sont fractionnés sur colonne de Sephadex G200 (1x30 cm) puis refractionnés sur une colonne (1,3x140 cm) de Sephadex G15. L'eau distillée sert d'éluant. Dans les échantillons obtenus (0,5 ml) on recherche les pentoses (orcinol-chlorhydrique), les hexoses (anthrone-sulfurique) ou la formation de formaldéhyde (avec l'acide chromotropique après oxydation periodique). Le débit est d'environ 1 ml par minute.

E) Electrophorèse de zone sur papier

L'électrophorèse de zone est réalisée sur papier Schleicher et Schull No. 2043a (1565) à 40 volts/cm et environ 150 mA, pendant 1-2 heures dans les solvants suivants:

F. pyridine-acide acétique-eau (10:4:86, en volumes) à pH 5,3 (Kickhöfen et Warth 1968)

G. 25 g de molybdate de sodium hydraté dans 1200 ml d'eau distillée sont ajustés à un pH 5,1 par addition d'acide sulfurique (Bourne et al. 1961)

F) Révélateurs des sucres

Les sucres sont en général révélés par le nitrate d'argent alcalin ou par le phtalate d'aniline.

G) Préparation du L-ribose

Le L-ribose est obtenu par épimérisation du L-arabinose: 300 mg de L-arabinose dissous dans 3 ml de pyridine anhydre sont chauffés à 135°C pendant 5 heures sous reflux.

Le L-ribose formé est isolé par chromatographie préparative sur papier Watman No. 4 dans le solvant A. La révélation au nitrate d'argent alcalin indique trois taches: celle due au L-arabinose non épimérisé, une tache migrant à la hauteur du ribose et une tache de R_{rib} = 1,06 qui est probablement du ribulose. Ce dernier n'est pas révelé par le phtalate d'aniline alors que les deux autres montrent la coloration rouge-brun caractéristique des pentoses. Le ribose ainsi isolé donne une réaction positive et caractéristique des pentoses avec l'orcinol-chlorhydrique. En chromatographie sur papier, il migre à la hauteur du ribose témoin dans plusieurs solvants différents (A, C, E).

H) Dosage des sucres acétylés par chromatographie en phase gazeuse (Sawardeker et al. 1965)

Les échantillons de (lipo)polysaccharides T1 (5 mg) dans l'acide sulfurique 0,5 N (3 ml) sont hydrolysés au bain-marie bouillant pendant une heure (libération quantitative des pentoses) et 12 heures (libération quantitative des hexoses), puis neutralisés par addition de carbonate de baryum solide. Après centrifugation les sucres sont

réduits en alditols par une solution à 1% de borohydrure de sodium (5 ml) pendant 3 heures à température ambiante. Après traitement par le Dowex 50 (H^+) jusqu'à pH 4 et concentration, on élimine l'acide borique libéré sous forme de borate de méthyle, par codistillation avec l'alcool méthylique (trois fois). Les alditols obtenus sont acétylé par 1 ml du mélange pyridine-anhydride acétique (1:1, en volumes) pendant 10 minutes à 100°C, puis séchés et repris par du chloroforme et analysés par chromatographie en phase gazeuse (colonne ECNSS-M 3% à 190°C).

I) Méthylation et acétylation (Hakomori 1964)

Les polysaccharides sont méthylés le plus complètement par la méthode de Hakomori (1964). Le lipopolysaccharide (5 à 10 mg) en solution dans le diméthyl sulfoxide (1 ml) est traité par la base forte: méthyl-sulfinyl-méthy sodium (1 ml) en solution dans le diméthyl sulfoxide. Par ce traitement les groupements hydroxyls sont ionisés (figure 3, a). Cette réaction est assez lente. On laisse reposer 12 heures à température ambiante avant de rajoute: l'iodure de méthyle. Il est nécessaire d'opérer en l'absence d'air et sous atmosphère d'azote. Les ions alcoxyde: formés réagissent rapidement avec l'iodure de méthyle (1 ml) qui est ajouté en excès (figure I,3 b). Ces réaction sont facilitées quand on place les échantillons pendant une heure dans un bain ultra sonique après addition des réactifs.

Après la méthylation le mélange réactionnel est versé dans environ 50 ml d'eau distillée et dialysé pendant 3 jours. On isole ainsi un polysaccharide méthylé après évaporation à 40°C dans un évaporateur rotatif.

a) $R\text{-}O\text{-}H + CH_3\text{-}SO\text{-}CH_2^- \text{ (I) } Na \longrightarrow R\text{-}O\text{-}Na^+ + CH_3\text{-}SO\text{-}CH_3$

b) $R\text{-}O\text{-}Na^+ + CH_3I \longrightarrow R\text{-}O\text{-}CH_3 + NaI$

Figure I,3. Les étapes de la réaction de méthylation sel Hakomori (1964)

La base forte est préparée à partir d'hydrure de sodium (3 g divisés dans l'huile à 50%). Celui-ci est tout d'abord lavé par de l'éther de pétrole puis mis en suspension dans du diméthylsulfoxyde (30 ml). Le tout est maintenu à 50°C sous agitation jusqu'à obtention d'une solution limpide verdâtre. Le réactif peut être conservé à 4°C dans un flacon hermétiquement fermé. Toutes les opérations doivent se dérouler sous atmosphère d'azote.

La figure I,4 donne un schéma des différentes opérations succédant à la méthylation du (lipo)polysaccharide.

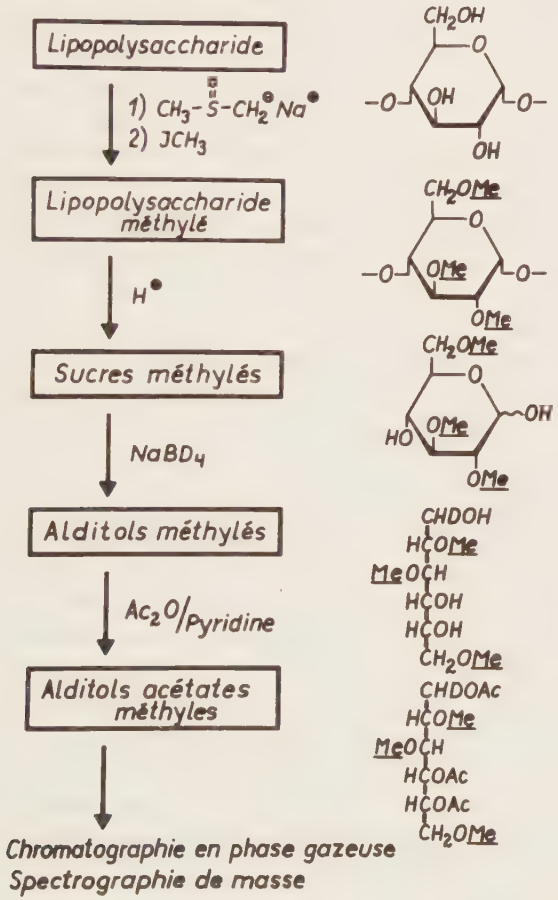


Figure I,4. Schéma du mode opératoire de la méthylation des lipopolysaccharides, de leur conversion en alditols et finalement de la formation des acétates d'alditols méthylés qui seront analysés.

Les (lipo)polysaccharides méthylés se dissolvent difficilement dans les solutions aqueuses. C'est pourquoi pour obtenir les sucres méthylés libres on commence par une courte hydrolyse par l'acide formique à 90% (3 ml) pendant trois heures à 100°C. Puis les échantillons sont évaporés à sec, redissous dans l'acide sulfurique 0,25 N (5 ml) et hydrolysés pendant 12 heures à 100°C. Ce mode d'hydrolyse donne lieu à peu de décomposition ou de déméthylation. L'hydrolysat est neutralisé par addition de carbonate de baryum solide, centrifugé et évaporé à sec. Il est repris par de l'eau lourde (5 ml) et séché. Les sucres partiellement méthylés sont réduits en alditols méthylés par le borodeutérure de sodium (50 mg) en présence d'eau lourde (5 ml) pendant 3 heures à température ambiante. Ceci permet de reconnaître le carbone initialement réducteur qui est marqué par le deutérium. Les sucres méthylés et réduits sont convertis en acétates, comme il a été décrit plus haut, et analysés par chromatographie en phase gazeuse et par spectrographie de masse.

I) Localisation des groupements O-acétyl

Une méthode a été mise au point pour la détection et la localisation de groupements O-acétyl. Le polysaccharide a été acétylisé par le méthylvinyl éther (blocquage des groupements OH), méthylé (groupement O-acétyl remplacé par un groupement O-méthyl) et analysé après réduction et acétylation par chromatographie en phase gazeuse. Quand il n'y a pas de groupements O-acétyl dans le polysaccharide on obtient les mêmes alditols acétylés que dans le cas d'un polysaccharide non acétalisé dans la première étape. Si par contre l'un des sucres est porteur d'un groupement O-acétyl, son dérivé alditol acétylé est remplacé par un nouveau pic qui correspond au même sucre mais porteur cette fois d'un groupement O-méthyl occupant la position du groupement O-acétyl d'origine.

K) Chromatographie en phase gazeuse et spectrographie de masse (Björndal et al. 1967a, 1967b)

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée à l'aide d'un appareil Varian Aerograph 1520 B muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les analyses sont pratiquées sur une colonne (200 cm x 0,3 cm) contenant 3% de ECNSS-M sur chromosorb G (80-100 mesh) à 190°C pour les alditols acétylés et 150°C pour les alditols partiellement méthylés et acétylés. ECNSS-M est une structure combinée d'éthylène succinate et de cyano-éthyl silicones. On a pu observer que dans le cas d'alditols acétylés, plus ou moins méthylés la réponse du détecteur était la même dans une marge de plus ou moins 5% quand on se base sur le poids des composés. C'est pourquoi on n'a pas tenu compte des facteurs de réponse. Pour la spectrographie de masse les mélanges de sucres acétylés et partiellement méthylés, dissous dans le chloroforme sont injectés dans une colonne ECNSS-M 3% montée sur un chromatographe en phase gazeuse, lui-même couplé à un spectrographe de masse LKB. Les spectres de masse sont effectués à une température d'injection de 250°C, pour un potentiel d'ionisation de 70 eV, avec un courant d'ionisation de 60 micro-ampères et une température de la source d'ionisation de 290°C.

L) Chromatographie en phase gazeuse des acides gras (Metcalfe et Schmitz 1961)

Les acides gras libres sont méthylés en présence de trifluorure de Bore (BF_3) en solution dans le méthanol (14%; Serva, Heidelberg) et analysés par chromatographie en phase gazeuse à 175°C (Perkin Elmer fractometer 20, détecteur à ionisation de flamme) sur une colonne (1,5 x 1/8 inch) contenant 2,5% de castorwax sur chromosorb G (80/100 mesh).

M) Détermination du pouvoir rotatoire des polysaccharides T1 pendant une hydrolyse partielle

Une cuvette de polarimètre (1 cm) thermostatée à 80°C est remplie d'une solution du polysaccharide dégradé

(1 mg) dans l'acide sulfurique 0,25N (1 ml). La variation du pouvoir rotatoire est mesurée à intervalles réguliers avec un polarimètre Perkin-Elmer 141.

N) Réactions de dégradation par oxydation périodique réalisées sur le lipopolysaccharide T1

Seuls seront oxydés les sucres ayant deux groupements hydroxyls voisins avec une préférence pour les groupements cis. Les hydroxyls trans sont oxydés après un temps plus long. La consommation du periodate est suivie à 225 nm. Pour une oxydation totale des groupements hydroxyls cis et trans il faut atteindre un plateau après lequel il n'y a plus de periodate consommé. Après destruction de l'excès du periodate par l'éthylène glycol les échantillons sont traités par le borohydrure de sodium en excès, pour réduire les groupements aldéhyde formés après oxydation.

1) Elimination ß (Ghuysen et al. 1968)

Dans cette dégradation le lipopolysaccharide T1, est traité par la soude après une oxydation partielle.

a) Oxydation partielle et traitement alcalin

Le lipopolysaccharide T1 (400 mg) est traité par le périodate de sodium 0,0165 M (100 ml) pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité. L'excès de périodate est détruit par addition d'éthylène glycol. La préparation est alors divisée en deux parties. Une partie est réduite par le borohydrure de sodium et analysée par chromatographie en phase gazeuse des dérivés acétates d'alditols.

L'autre contenant le lipopolysaccharide T1 oxydé partiellement et non-réduit (200 mg dans 100 ml de solution) est incubé en présence de soude 0,05 N (100 ml) pendant 30 minutes à 37°C. Le mélange est à nouveau séparé en deux parties dont l'une est réduite et l'autre étudiée directement après purification.

b) Purification de ces deux échantillons

b.a Purification du produit oxydé, traité par la soude et non-réduit: Le mélange réactionnel contenant les fragments de lipopolysaccharide T1 oxydé (environ 100 mg) et la soude a été neutralisé par l'acide

acétique concentré (10 ml) et précipité par l'éthanol 80%. Le précipité dissous dans l'eau a été reprécipité dans les mêmes conditions, centrifugé et séché. Les surnageants ont été réunis, évaporés à sec et purifiés par électrophorèse de zone sur papier (solvant F) des sels qui les contaminent. Seule la fraction neutre a été éluée et étudiée.

Les préparations ainsi obtenues ont été fractionnées sur une colonne de gel de dextrane Sephadex G 15 (diamètre 1,3 cm, longueur 140 cm).

Les échantillons élués par l'eau distillée ont été analysés colorimétriquement pour la recherche des pentoses (orcinol-chlorhydrique) et des hexoses (anthrone-sulfurique).

b.b Purification du produit oxydé, traité par la soude et réduit . Ce produit a été purifié des sels contaminants par électrophorèse de zone sur papier (solvant F). La fraction neutre a été éluée et fractionnée sur colonne de Sephadex G 15 comme dans le cas précédent. Dans les échantillons élués par l'eau distillée on a recherché les pentoses (orcinol-chlorhydrique) et le formaldéhyde (libéré après une oxydation supplémentaire au periodate. Ce formaldéhyde devrait provenir des sucres initialement liés à la position C3 des restes d'arabinose (aldéhyde) qui ont été ß-éliminés et réduits.

2) Dégradation selon Smith du lipopolysaccharide T1 (Goldstein et al. 1965)

a) Etude préliminaire

Pour trouver les conditions d'hydrolyse qui rompent seulement les liaisons des sucres oxydés et non les furanosides (ribose et arabinose) le lipopolysaccharide T1 d'origine a été soumis à une hydrolyse ménagée sous des conditions diverses. Nous avons retenu le cas où le lipopolysaccharide T1 (5 mg) a été hydrolysé par l'acide chlorhydrique 0,1 N à 37°C pendant 7 heures puis analysé après filtration sur colonne de Sephadex G 200 (1 x 35 cm). Les échantillons ont été testés pour la dégradation des pentoses (orcinol-chlorhydrique).

b) Oxydation totale et hydrolyse du lipopolysaccharide T1

Le lipopolysaccharide T1 est oxydé par le periodate de sodium 0,0165 M pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. L'excès de periodate est détruit par l'éthylène glycol. Les groupements aldéhydes formés sont réduits par addition de borohydrure de sodium (3 heures à température ambiante). Le lipopolysaccharide est purifié par dialyse contre de l'eau distillés pendant 2 jours et lyophilisé.

Le lipopolysaccharide T1 oxydé totalement et réduit (60 mg) a été hydrolysé pendant 3,5 heures à 37°C par l'acide chlorhydrique 0,1N et puis neutralisé par la résine échangeuse d'ions Amberlite IRA 410 (forme carbonate). Une partie aliquote correspondant à environ 5 mg a été fractionnée sur colonne de Sephadex G 200 de la même manière que le lipopolysaccharide T1 cité plus haut. Les échantillons ont été testés pour la présence de pentoses et leur faculté à libérer du formaldéhyde après une nouvelle oxydation periodique. Les 55 mg restants de lipopolysaccharide T1 oxydé ont été fractionnés de la même manière.

IV. Isolement de la ribokinase et phosphorylation du ribose

1) Isolement de l'enzyme.

La ribokinase est préparée selon la méthode de Horecker (1957) avec quelques modifications. *Klebsiella pneumoniae* a été cultivée sur milieu synthétique en présence de D-ribose. Les bactéries (1,5 g, poids humide) sont mises en suspension dans environ 15 ml de tampon TRIS à pH 7,5 (chlorure de trihydroxyméthyl amino méthane). La suspension est traitée quatre fois 30 secondes par un homogénéiseur (ultraturax) en présence de perles de verre (9 g; 0,08 mm de diamètre). Entre chaque opération la suspension est refroidie 30 secondes dans un bain de glace. L'homogénat est centrifugé 20 minutes à 18.000 g. Pour éliminer les acides nucléiques, le sur-

nageant est traité plusieurs fois de suite par environ 20 ml d'une solution aqueuse de sulfate de protamine (1% à 0°C). Le précipité est éliminé après chaque addition. Le surnageant final est chauffé 5 minutes à 60°C à pH 5,8, centrifugé et neutralisé. L'extrait enzymatique est conservé à -20°C.

2) Phosphorylation du ribose

On laisse incuber 0,25 µmoles de sucre en présence de 1,25 µmoles de $MgCl_2$, 2,5 µmoles d'adénosine triphosphate (ATP), 6,25 µmoles de tampon tris pH 7,5 et de 100 µlitres d'extrait enzymatique dans un volume total de 300 microlitres. Après incubation de 60 minutes à 25°C on ajoute 40 µlitres d'acétate de baryum 0,5 M et 1 ml d'éthanol. Le précipité est centrifugé et lavé deux fois avec 100 µlitres d'éthanol. Le précipité contient le ribose-5-phosphate et le surnageant alcoolique les sucres non phosphorylés. Des fractions aliquotes des surnageants sont concentrées et analysées par la méthode de Brown à l'orcinol-chlorhydrique pour la recherche des pentoses. Dans le précipité lavé deux fois avec 100 µlitres d'eau distillée, on recherche la présence de ribose-5-phosphate par électrophorèse de zone sur papier dans le solvant F à pH 5,4.

V. Critiques de ces méthodes

1) Méthodes de dosages

Au début de notre travail nous avons utilisé des méthodes de dosage colorimétrique des sucres. Par la suite nous avons préféré faire appel au dosage des dérivés acétates d'alditols des sucres par chromatographie en phase gazeuse. Cette dernière méthode nous a semblé plus fidèle. Elle permet de doser le tréitol et de distinguer entre le ribose et l'arabinose formé après oxydation periodique. Dans les méthodes colorimétriques il faut toujours compter avec l'interférence des sucres les uns

avec les autres, car nous sommes toujours en présence de mélange des sucres.

Cette méthode a pourtant l'inconvénient de ne doser ni la glucosamine ni le KDO.

Les dosages colorimétriques n'ont été utilisés par la suite que dans l'analyse des fractions éluées des colonnes de Sephadex.

2) Méthylation

Il est difficile de dire si la méthylation est complète dans tous les cas. Il est possible de détecter les groupements hydroxyls ayant échappés à la méthylation par leur absorption dans l'infra-rouge entre 3400 et 3600 cm^{-1}; mais des traces d'eau donnent une image fausse des résultats. On peut également voir si la méthylation a été insuffisante en chauffant les acétates d'alditols méthylés à une température plus élevée (190°C) pour obtenir les dérivés non méthylés qui sont plus lents. Le rapport sucres terminaux à sucres disubstitués devrait être le même ce qui nous donne une autre confirmation.

Il faut toujours compter avec une certaine dégradation, une déméthylation lors de l'hydrolyse et la perte de sucres méthylés plus volatiles pendant les opérations de concentration et d'évaporation à sec.

C H A P I T R E II

COMPOSITION CHIMIQUE ET SPECIFICITE SEROLOGIQUE DES ANTIGENES T1

I. COMPOSITION CHIMIQUE DU LIPOPOLYSACCHARIDE T1

A) Introduction

Dans une première étape nous avons étudié la composition chimique du lipopolysaccharide extrait du mutant T1 dérivé de Salmonella friedenau. Les lipopolysaccharides sont extraits par le mélange homogène à chaud de phénol:eau (Westphal et Jann 1965) et purifiés par ultracentrifugation. Quand ces préparations sont soumises à une hydrolyse acétique (1%) on peut isoler un constituant lipidique (lipoide A) et un constituant polysaccharidique; le pourcentage des protéines est négligeable.

Constituants	% poids
polysaccharide	52
lipoide A	32
protéines	traces
phosphore	2
(phosphates)	~ (6)
taux d'humidité	~ 10

Ces constituants seront étudiés dans les paragraphes suivants. L'étude du lipopolysaccharide T1 a porté principalement sur le lipopolysaccharide obtenu à partir de S. friedenau T1.

B) Etude de la fraction lipidique (lipoide A) et des protéines

Comme tous les lipopolysaccharides , le lipopolysaccharide T1 contient un composant de nature lipidique

nommé lipoide A . De nombreux résultats tendent à montrer une identité de structure chimique des lipoides A de tous les antigènes somatiques des Salmonelles. Sa composition est très semblables dans le cas de la plupart des Entérobactéries. On a étudié la structure du lipoide A isolé à partir d'un mutant R de S. minnesota (Gmeiner et al. 1969, Rietschel et al. 1971).
Le lipoide A contient un squelette phosphorylé de:

Ⓟ-4-D-glucosamine $\xrightarrow{\beta\ 1,6}$ D-glucosamine-1-Ⓟ

dont les groupements hydroxyls sont estérifiés par des acides gras et les groupements aminés par l'acide ß-hydroxymyristique exclusivement.

Le lipopolysaccharide de S, friedenau T1 contient 32% de lipoide A dont 15,6% d'acides gras. Le tableau II,1 montre les différents acides gras identifiés dans le lipoide A de S.friedenau T1 et leurs proportions relatives comparées aux résultats trouvés pour le mutant R 595 de S. minnesota.

Tableau II,1. Acides gras constituant le lipoide A de S. friedenau T1 comparés à ceux du lipoide A de S. minnesota R 595.

Acides gras	S.friedenau T1 mole %		S.minnesota R 595 mole %	
Acide laurique.....	15,3		12,7	
Acide myristique...	18,5		13,6	
Acide palmitique...	5,3		15,0	
Acide ß-hydroxy-myristique.....	49,7	(60,8)	47,0	(58,3)
Acide tétradécénoique.....	11,1		11,3	

L'acide tétradécénoique provient d'un acide ß-hydroxy-myristique (substitué en ß par une liaison ester) après élimination ß pendant l'hydrolyse alcaline (Rietschel, thèse 1971).

D'après ces résultats il semble qu'il y ait peu de différences dans la composition du lipoide A de S.friedenau T1 et des autres Salmonelles , sauf en ce qui concerne la quantité d'acide palmitique.

Morgan (1940, 1941) et Goebel (Binkeley et al. 1945) purent isoler une protéine conjuguée à partir de Shigella dysenteriae, de Salmonella typhi et de Shigella flexneri. Après extraction au mélange phénol:eau on ne trouve que de faibles quantités de protéines qui sont sans doute liées de manière covalente au lipoide A (Wober et Alaupovic). Ces protéines n'ont pas été étudiées dans le lipopolysaccharide de S. friedenau T1.

C) Etude des sucres constitutifs du lipopolysaccharide T1

Tous les lipopolysaccharides de formes T1 contiennent à coté du composé de nature lipidique (lipoide A), deux groupes de sucres : les uns sont présents en petite quantité de 4 à 9 % , ce sont , l'acide 2-céto-3-désoxy-manno-octulosonique , le L-glycéro-D-mannoheptose, la glucosamine et le glucose. Ces sucres sont dérivés du noyau polysaccharidique du "core" commun à toutes les Salmonelles (figure 9, page 19). Les autres représentent les sucres principaux , spécifiques de la forme T1 ,(14 à 22 %) et se composent de galactose et d'un pentose (Kauffmann et al. 1962; Lüderitz et al. 1966a) qui a été identifié par chromatographie sur papier comme étant le ribose.

1) Identification du ribose des lipopolysaccharides T1 comme étant le D-ribose

L'identification du ribose est tout d'abord basée sur une étude par chromatographie sur papier. Il a été isolé par chromatographie préparative sur papier à partir d'un hydrolysat du lipopolysaccharide de S.friedenau T1 . La con-

centration en ribose dans l'éluat a été déterminée par dosage à l'orcinol-chlorhydrique (page 3 7) . La configuration D ou L du ribose a été mise en évidence grâce à l'action de la ribokinase qui catalyse spécifiquement la conversion du D-ribose en D-ribose-5-phosphate (Horrecker 1957, page 49). Le ribose isolé a été incubé en présence de ribokinase en même temps que divers sucres de référence comme le D-ribose et le L-ribose préparé à partir de l'arabinose (page 41). Dans le cas du D-ribose et du ribose provenant du lipopolysaccharide T1 il n'y a plus de ribose dans le surnageant alcoolique après 30 minutes d'incubation. Par contre , on retrouve la presque totalité du L-ribose non-phosphorylé après 30 minutes d'incubation (tableau II,2).

Tableau II,2. Réaction du ribose provenant du lipopolysaccharide T1 avec la ribokinase.

Temps d'incubation (minutes)	Ribose inchangé retrouvé dans les surnageants (% de la quantité initiale)[a]		
	Ribose T1	D-ribose	L-ribose
0,5	75	65	ND[b]
2	23	40	ND
5	4	7	ND
30	0	0	ND
60	0	0	90

a) Dosage du ribose dans les surnageants des mélanges incubés par la réaction avec l'orcinol-chlorhydrique, après précipitation du D-ribose-5-phosphate par l'éthanol.
b) Non dosé (ND).

Dans une autre expérience les mêmes sucres , avec en plus une autre série de sucres de contrôle (D-xylose,L-arabinose, D-altrose, D-érythrose) ont été traités de la même

manière. Dans ce cas les précipités sont étudiés par électrophorèse de zone sur papier (solvant F, pH 5,3). La figure II,1 montre que seuls le ribose (T1) et le D-ribose témoin ont été convertis en sucres phosphates , les autre restent inchangés à leur position de départ (ligne neutre).

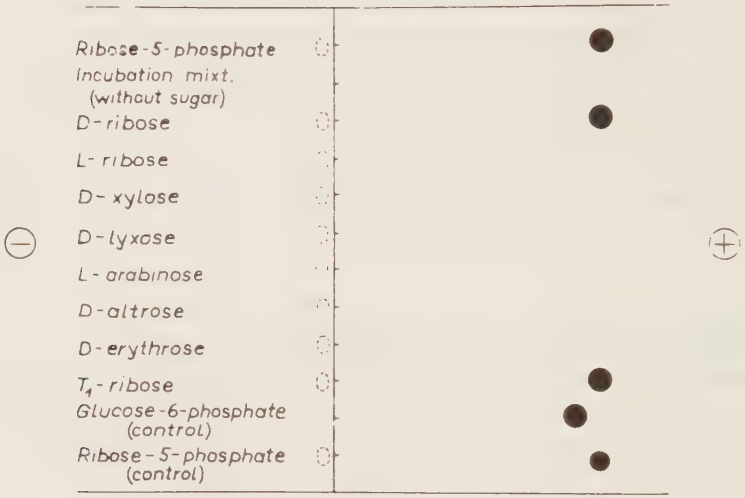


Figure II,1. Schéma montrant la conversion du D-ribose et du ribose isolé à partir du lipopolysaccharide T1 , en ribose-5-phosphate par la ribokinase en présence d'ATP (Wheat et al. 1967).

2) Présence du ribose dans les lipopolysaccharides d'autres Salmonelles

Il a déjà été montré (Kauffmann et al. 1960) que non seulement le groupe T1 des Salmonelles mais aussi certains groupes appartenant à la forme sauvage (groupes 28; groupe 52: S.utrecht ; groupe 56 : S.artis) peuvent contenir également du ribose. La concentration en ribose trouvé dans ces lipopolysaccharides varie entre 5 et 7 % (tableau II,3).

Tableau II,3. Quantité de ribose trouvé dans différents lipopolysaccharides de Salmonelles.

Chimiotypes	No. testés	Ribose %
Groupes O: 28,52, 56	3	5 à 7
Autres groupes O	3	1
Mutants T1	5	15 à 22
Mutant S.minnesota Ra	5	2 à 5
Mutant S.minnesota Ra "polysaccharide dégradé"	2	3 à 6
Mutant S.typhi murium Ra	6	0,9 à 1
Autres mutants Ra	4	1 à 4
Mutant S.minnesota Rb	2	0,1 à 0,5
Mutant S.minnesota Rc	2	0,5
Mutant S.minnesota Rd	3	0,2 à 0,4
Mutant S.minnesota Re	2	0,2

Le ribose a été identifié comme étant le D-ribose par réaction avec l'orcinol-chlorhydrique, par chromatographie sur papier et par réaction avec la ribokinase. Dans d'autres formes S on a pu déceler 1% d'un composé réagissant positivement avec l'orcinol, mais ici , étant donné les faibles quantités , on ne peut exclure une contamination par les acides nucléiques. Ceux-ci sont en effet, difficiles à éliminer intégralement.

La présence de ribose a été également recherchée dans les lipopolysaccharides de mutants Ra et autres R. Il a pu être mis en évidence de 1 à 5 % de ribose dans les mutants Ra (spécialement de S.minnesota R60) et des quantités inférieures à 1% dans les autres. Ces résultats pourraient indiquer que dans certains cas le ribose est aussi un sucre

constitutif des lipopolysaccharides Ra .

3) Sucres composant les lipopolysaccharides T1

Le tableau II,4 donne les résultats d'une analyse comparant les sucres constituant les lipopolysaccharides extraits de S.friedenau forme S, (Simmons et al. 1965), S. friedenau forme T1 et S.poona forme Ra (Sutherland et al. 1965). S.poona ne diffère de S.friedenau que par ses antigènes flagellaires (z;1,6 et d; 1,6 respectivement).

Dans les deux mutants T1 et Ra les sucres spécifiques de l'antigène O sont absents (fucose et galactosamine). La composition des lipopolysaccharides T1 et Ra est similaire sauf en ce qui concerne le ribose et le galactose présents en grande quantité dans le mutant T1.

En conclusion: le D-glucose , le D-galactose, la D-glucosamine et le D-ribose sont des constituants des lipopolysaccharides T1. Le heptose a sans doute la structure du L-glycéro-D-mannoheptose et le dernier sucre l'octose , celle de l'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique. La configuration D ou L a été démontrée par l'utilisation de méthodes de dosage enzymatiques.

Par la suite toutes les études porteront sur les lipopolysaccharides obtenu à partir de S.friedenau T1.

4) Composition des lipopolysaccharides dégradés de S.friedenau T1

a) Lipopolysaccharides dégradés par l'acide acétique

L'hydrolyse acétique permet de séparer le polysaccharide du lipoide A. Il y a coupure au niveau du KDO (acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique) . Ceci permet également de travailler avec un matériel plus soluble . Débarassé du lipoide A il est probable que le polysaccharide se présente sous forme de chaînes isolées. Le lipopolysaccharide lui-même a tendance à former des aggrégats difficilement solubles, il donne des solutions très opalescentes.

Tableau II,4. Sucres constituant les lipopolysaccharides des Salmonelles des groupes 13 et 22

Lipopolysaccharides	Sucres des lipopolysaccharides (%)							
	KDO	Heptose	D-glucosamine[a]	D-glucose	D-galactose	Galactosamine	L-fucose	D-ribose
S.friedenau forme S[b] (type sauvage).....	5	3,1	8,1	5,9	11,6	27,7	8,7	1
S.friedenau forme T1.	3,6	5,3	6,3	4,4	18,7	0	0	22,9
S.poona forme Ra[a]....	4	8,4	9,3	4,9	5,5	0	0	3,0

a) Somme de la glucosamine présente dans le lipoide A et dans le polysaccharide.

b) Résultats tirés de Simmons et al. . 1965.

c) Résultats tirés de Sutherland et al. 1965.

Tableau II,5. Sucres constituant les lipopolysaccharides dégradés obtenus à partir des lipopolysaccharides et des bactéries de S.friedenau T1

Echantillons	Sucres des (lipo)polysaccharides (%)					
	KDO	Heptose	D-glucosamine[a)]	D-glucose	D-galactose	D-ribose
Lipopolysaccharide T1.....	4,2	7,5	7,1	4,6	17,2	21
Polysaccharide T1 dégradé (à partir du lipopolysaccharide).....	5,3	12,3	7,8	7,0	30	21
Polysaccharide T1 dégradé (à partir de la bactérie)...	0,8	9,3	4,0	5,3	32	25
Lipopolysaccharide T1 traité aux alcali (60 min 56°).....	5,3	9,5	7,0	3,9	21	28

a) Dans les lipopolysaccharides c'est la somme de la glucosamine contenue dans le lipoide A et le polysaccharide qui est dosée. Dans les polysaccharides seule la glucosamine du polysaccharide est dosée.

Comme le montre le tableau II,5 le lipopolysaccharide T1 dégradé se compose des mêmes sucres que le lipopolysaccharide d'origine . Dans le surnageant alcoolique on a pu détecter de faibles quantités de ribose et de galactose libres ou sous forme d'oligosaccharides.

Un polysaccharide peut être également isolé directement par traitement des bactéries par l'acide acétique selon la méthode de Freeman (1942), modifiée par Staub (1965). Cette préparation présente également une forte concentration de ribose et de galactose. Sa composition est très voisine de celle du polysaccharide T1 dégradé obtenu à partir du lipopolysaccharide T1 sauf en ce qui concerne le KDO qui est plus sensible à l'hydrolyse acétique dans le premier cas. Il est possible que lors de l'extraction au phénol:eau une certaine proportion de KDO soit déjà dégradée. Il faut remarquer aussi la présence de glucosamine , trouvée également dans les polysaccharides dégradés obtenus à partir des mutants Ra et non à partir des autres mutants R (Sutherland et al. 1965), Ceci indique une relation structurelle entre les antigènes T1 et Ra . On discutera plus loin d'autres raisons pour que les lipopolysaccharides T1 contiennent le "core" complet Ra .

b) Lipopolysaccharide T1 traité par la soude 0,25 N

En vue d'étudier la sensibilité aux alcalis de la liaison pentosidique , le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 a été traité par la soude 0,25 N à 56°C pendant 60 minutes (page 31). Ce traitement élimine les acides gras du lipoide A en formant leurs sels de sodium. La quantité de ribose et de galactose se retrouve inchangée dans le précipité : 21 et 20 % respectivement, c'est à dire avec un rendement de 100 % par rapport au lipopolysaccharide d'origine (tableau II,5).

Dans une deuxième expérience le lipopolysaccharide T1 est incubé en présence de soude 0,3 N (18 heures, 37°C, page 31). Le ribose est retrouvé intact dans le polysaccharide Ceci prouve qu'il n'est pas un élément de structure des acides nucléiques (Volkin et Cohn 1954). Les spectres ultraviolets de solutions du lipopolysaccharide T1 ne présentent aucune absorption caractéristique des acides nucléiques à 260 nm.

Tableau II,7. Analyse des sucres des (lipo)polysaccharides de S.friedenau T1 avant et après oxydation au periodate de sodium et réduction au borohydrure de sodium.

Echantillons	Quantité dans les échantillons (%)											
	KDO		heptose		glucose		glucosamine		galactose		ribose	
	Avant IO4	Après IO4	Avant IO4	Après IO4	Avant IO4	Après IO4	Avant IO4	Après IO4	Avant IO4	Après IO4	Avant IO4	Après IO4
Lipopolysaccharide T1.....	4,2	1,02	7,5	2,0	4,6	2,2	7,1	6,0	17,2	1,2	21	20
Lipopolysaccharide T1 traité aux alcalis (60 min. 56°).....	5,35	0,7	9,5	1,3	3,9	3,3	7,0	3,9	21	2,5	20	25
Polysaccharide dégradé à partir du lipopolysaccharide.....	5,3	0,25	12,3	2,1	7,0	5,8	7,8	1,7	30	4,0	21	24
Polysaccharide dégradé à partir des bactéries.....	0,8	ND[a)]	9,3	1,9	5,3	3,0	4,0	ND	32	7,6	25	30

a) ND signifie non dosé

Ces résultats montrent que dans le lipopolysaccharide T1, le ribose n'est pas lié par liaison phosphoester.

c) (Lipo)polysaccharides T1 oxydés ($NaIO_4$) et réduits ($NaBH_4$)

Le lipopolysaccharide T1 et les produits de dégradation discutés ci-dessus (polysaccharides dégradés par l'acide acétique, lipopolysaccharide traité par la soude) ont été oxydés par le métaperiodate de sodium et réduits par le borohydrure de sodium. En comparant avec le produit de départ on obtient un rendement de 55 % (lipopolysaccharide T1), 59 % (lipopolysaccharide T1 traité par la soude), 48 % (polysaccharide T1 dégradé par l'acide acétique) et 53 % (polysaccharide T1 dégradé obtenu à partir des bactéries) .

Une étude par chromatographie sur papier et en couche mince de cellulose (solvants A et D) des hydrolysats de ces produits a permis d'identifier une quantité importante de ribose et, de l'arabinose, du glucose et du mannose(probablement dérivé du L-glycéro-D-mannoheptose : Bagdian et al. 1966; Cherniak et al. 1966; Foster et al. 1958; Dröge et al. 1968). Les mêmes hydrolysats soumis à l'électrophorèse de zone sur papier dans le solvant G, ont révélé la présence de thréitol sans doute dérivé du galactose.

Le tableau II,6 montre parallèlement les résultats des analyses quantitatives des sucres dans ces préparations avant et après oxydation periodique. Dans tous les cas le KDO, le héptose et le galactose sont détruits presque quantitativement. Le ribose est le seul sucre qui résiste à l'action du periodate de sodium.

Après oxydation on retrouve une quantité de pentoses supérieure à celle du produit de départ , ceci est dû à l'apparition de l'arabinose. La méthode de dosage à l'orcinol-chlorhydrique ne dose que les pentoses totaux et ne permet pas distinguer entre deux pentoses différents. La glucosamine donne des résultats variables suivant la préparation. Ceci est dû probablement à la présence ou à l'absence de lipoide A dans la préparation.

5) Comparaison des lipopolysaccharides des mutants T1 avec ceux des mutants Ra et Rb

Les mutants Rb synthétisent un lipopolysaccharide Rb spécifique et en plus , contrairement aux mutants Ra , un polysaccharide soluble intracellulaire portant la spécificité O de la bactérie d'origine.Après extraction au phénol:eau (45:55, en volumes) et sédimentation du lipopolysaccharide Rb à 100 000 g ces polysaccharides O se retrouvent dans le surnageant (fraction L1), (Beckmann et al. 1964b; Lüderitz et al.1965). L'examen de tels surnageants obtenus à partir des lipopolysaccharides T1, après hydrolyse et analyse par chromatographie sur papier , montre l'absence de sucres O-spécifiques comme la galactosamine et le fucose (S.friedenau T1). Seuls le glucose , le galactose et le ribose peuvent être mis en évidence. Ceci démontre que les formes T1 comme les mutants Ra ne synthétisent pas de polysaccharides O-spécifiques. Ces résultats suggèrent que les formes T1 synthétisent un lipopolysaccharide T1 et un polyoside T1 (haptène) de même que les formes S synthétisent un lipopolysaccharide O et un polyoside O. Les deux haptènes T1 et O ne contiennent pas le noyau polysaccharidique du "core".

II. CARACTERISATION SEROLOGIQUE DES LIPOPOLYSACCHARIDES T1

A) Inhibition de la hémagglutination (page 35)

En vue de détecter une possible relation sérologique , les lipopolysaccharides T1 ont été testés comme inhibiteurs dans les systèmes hémagglutinants Rb/anti Rb et Ra /anti Ra. Comme le montre le tableau II,7 les lipopolysaccharides T1 sont de bons inhibiteurs du système Ra (lipopolysaccharide Ra traité aux alcalis , puis fixés sur des érythrocytes , en présence de sérum anti S.inverness Ra). De même le lipopolysaccharide de S.minnesota Ra (R60) est un bon inhibiteur du système hémagglutinant T1. Il n'y a aucune réaction croisée entre les lipopolysaccharides T1 et le système Rb. Les polysaccharides T1 dégradés sont aussi de

Tableau II,8. Inhibition de la hémagglutination des systèmes T1 , Ra et Rb par différents (lipo)polysaccharides.

Inhibiteur	Systèmes hémagglutinants homologues			
	S.friedenau T1	S.dessau T1	S.minnesota Ra (R60)	S.minnesota Rb
Lipopolysaccharides de forme S contenant du ribose				
S.halle(groupe 28)...	> 250			
S.tel aviv.....	> 250			
S.ezra(groupe 28)....	> 250			
S.utrecht (52).....	> 250			
S.artis (56).....	> 250			
Lipopolysaccharides T1				
S.typhi murium T1....			0,2	> 250
S.paratyphi B T1.....	2	0,05	0,2	> 250
S.dessau T1.....	0,5	0,05	0,1	> 250
S.friedenau T1.....	0,5	0,1	0,1	> 250
(Lipo)polysaccharides dégradés de S.friedenau T1				
Lipopolysaccharide traité aux alcalis....	3,9	0,3	15	
Polysaccharide dégradé (précipité éthanol 80%)	> 250	63	15	
Polysaccharide dégradé à partir des bacteries	> 250	0,1	31	
Lipopolysaccharide T1 traité par IO_4^-/BH_4^-...	2	1	0,1	
Lipopolysaccharide T1 traité par alcalis puis par IO_4^-/BH_4^-.....	2	1		
Polysaccharide dégradé (éthanol 80%) traité par IO_4^-/BH_4^-	> 250	> 250	250	
Lipopolysaccharide T2 S.bareilley.....	> 250	> 250	125	> 250
Lipopolysaccharides Ra S.minnesota Ra.....	0,5	0,2	0,5	> 250
S.typhi murium TV149		0,5	2	> 250
Lipopolysaccharide Rb S.minnesota Rb.....	> 250		250	1
Sucres libres				
Ribose.....	9 000		75 000	
Galactose.....	90 000		90 000	

Les lipopolysaccharides sont traités aux alcalis et fixés sur des érythrocytes. Les nombres représentent la quantité minimale de produit (µg/ml) nécéssaire à l'inhibition complète de la hémagglutination dans le système choisi (voir page 35).

bons inhibiteurs du système Ra mais montrent des réactions variables dans les systèmes T1 . Ceci n'a pas encore trouvé d'explication. Le ribose libre , à l'encontre du galactose montre une très faible activité inhibitrice dans les deux systèmes. Les lipopolysaccharides dérivés de formes S n'inhibent pas le système T1 ce qui prouve que les groupes déterminants de ces antigènes O sont différents de ceux de l'antigène T1.

B) Analyse des précipités spécifiques et inhibition de la précipitation des antigènes T1

1) Précipitation du lipopolysaccharide T1 et du lipopolysaccharide T1 traité aux alcalis

Le lipopolysaccharide de S.friedenau T1, en présence du sérum homologue donne une courbe de précipitation typique (figure II,2A), Les protéines dans les précipités ont été dosées par la réaction de Folin (page 39) et le ribose par l'orcinol-chlorhydrique (page 38). Les grandes quantités de ribose trouvées dans les précipités laissent à penser que celui-ci forme une liaison covalente avec le lipopolysaccharide T1.

20µg de lipopolysaccharide T1 contenant 20 % de ribose précipitent le maximum de protéine-anticorps contenu dans 10 µl de sérum anti T1 (zone d'équivalence). La quantité maximale de lipopolysaccharide est précipitée quand 70 µg de lipopolysaccharide T1 sont ajoutés à l'antisérum. Sous ces conditions environ un tiers du lipopolysaccharide est retrouvé dans le précipité (25µg). Ceci est calculé à partir des valeurs trouvées pour le ribose. D'autre part le lipopolysaccharide T1 est précipité quantitativement quand 10 µg ont été ajoutés à l'antisérum.

La courbe de précipitation obtenue avec le lipopolysaccharide T1 et le sérum anti S.minnesota Ra présente une allure analogue, seule la quantité d'anticorps précipités est plus importante (tableau II,8).

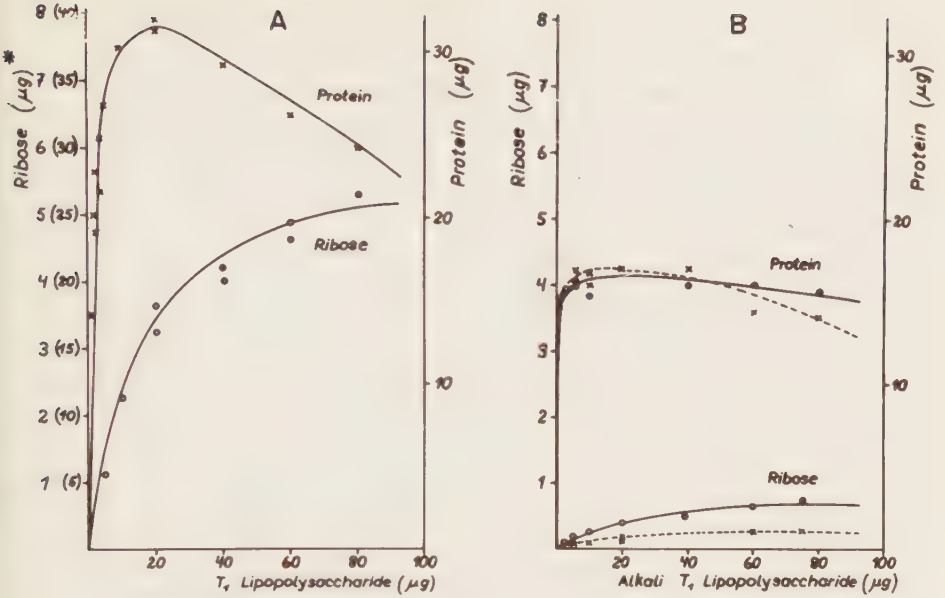


Figure II,2. Courbes de précipitation du lipopolysaccharide T1 (A) et des lipopolysaccharides traités par la soude à 56°C pendant 5 minutes (ligne continue) et 60 minutes (ligne pointillée). Chaque tube contient 10 µlitres de sérum anti S.friedenau T1. Les valeurs entre parenthèses (µg de lipopolysaccharide précipité) sont calculées à partir des résultats obtenus pour le dosage du ribose (Wheat et al. 1967).

La figure II, 2B montre la courbe obtenue quand la même expérience est réalisée avec un lipopolysaccharide T1 traité par la soude 0,25 N (pendant 5 ou 60 minutes à 56°C). Les courbes montrent que les deux produits ne fixent que la moitié de la quantité d'anticorps en comparaison avec le lipopolysaccharide d'origine. De plus la quantité de ribose présente dans les précipités est très diminuée surtout dans le cas du lipopolysaccharide traité aux alcalis pendant 60 minutes. Il semble que la précipitabilité de la molécule renfermant le ribose diminue quand le temps d'incubation en présence d'alcalis augmente. Par dosage à l'orcinol-chlorhydrique le ribose a pu être détecté dans les surnageants non-

Tableau 9 Précipitations sérologiques de différentes fractions obtenues à partir du lipopolysaccharide T1 par les antiséra de S.friedenau T1 et de S.minnesota Ra

Echantillons	Antisérum T1		Inhibition maximale causée par les échantillons	Antisérum Ra (R60)		Inhibition maximale causée par les échantillons
	Maximum de protéines précipitées	Maximum de ribose précipité		Maximum de protéine précipitée	Maximum de ribose précipité	
	µg	µg	%	µg	µg	%
Lipopolysaccharide T1.....	31	5,4[c]	-	87[a]	5,2[c]	-
Lipopolysaccharide T1 IO4/NaBH4	36[a]	non dosé	-	85[a]	non dosé	0
Lipopolysaccharide T1 traité aux alcali (60 minutes).....	17[a]	0,3[c]		48[a]	1,3[c]	
Lipopolysaccharide T1 traité aux alcali puis IO4/NaBH4.....	0	-	0	0	-	90
Polysaccharide T1 dégradé (fraction précipitée par l'éthanol 80 %).....	6[b]	-	18	10[b]	-	90
Polysaccharide T1 dégradé (80% éthanol) IO4/NaBH4.....	0	-	0	0	-	90
Polysaccharide T1 dégradé obtenu à partir des bactéries	16[b]	4 0,1[c]	non dosé	non dosé	non dosé	non dosé

a) et b) représentent les quantités de protéines précipitées par les échantillons contenant 20 µg et 3 µg de préparation respectivement.

c) représente le ribose dans les précipités des échantillons qui contiennent 80 µg de la préparation.

d) L'inhibition a été testée après isolement du surnageant de chaque échantillon et addition de 30 µg du lipopolysaccharide T1 d'origine. Le précipité formé a été testé pour la présence de protéines (Folin). 10 µlitres de sérum anti T1 et anti Ra ont été ajoutés à chaque échantillon au départ.

précipitables. Aucune étude quantitative n'était possible à cause de l'interférence dans la réaction colorée des constituants du sérum, contenu dans les surnageants. Des courbes analogues ont été obtenues avec le sérum anti Ra . Dans ce cas la quantité de ribose trouvée dans les précipités est elle aussi diminuée par rapport au lipopolysaccharide d'origine.

Le polysaccharide dégradé préparé à partir des bactéries se comporte comme le lipopolysaccharide traité par la soude. Le dosage du galactose (cystéine-sulfurique) dans les précipités de ces différents systèmes, bien que moins précis , donne des résultats parallèles à ceux du ribose. Dans le système Ra la quantité de galactose précipité est sensiblement plus élevée que celle du ribose. Ceci peut être expliqué par le fait que le galactose est aussi un constituant du "core" des lipopolysaccharides.

Il semble qu'après traitement alcalin ou acide , il y ait libération de ribose et de galactose sous forme d'une molécule non-précipitable par les antisera, mais assez grande pour ne plus être dialysable.

Les mêmes préparations ont été testées après oxydation au periodate et réduction au borohydrure de sodium.

2) Précipitation des lipopolysaccharides oxydés au periodate de sodium puis réduits

Comme le montre le tableau II,8 le lipopolysaccharide T1 oxydé et réduit se comporte dans les deux séra comme le lipopolysaccharide d'origine. Les lipopolysaccharides T1 traités aux alcalis et le polysaccharide dégradé après oxydation/réduction ne précipitent ni dans le sérum anti T1 ni dans le sérum anti Ra, (figure II, 3).

3) Inhibition de la précipitation

Après élimination des précipités obtenus avec les préparations dégradées , on ajoute à chaque surnageant la même quantité de lipopolysaccharide T1 (30µg). On remarque la différence de réaction entre les deux séra. Les trois préparations

suivantes : polysaccharide T1 dégradé, polysaccharide T1 dégradé, oxydé et puis réduit et lipopolysaccharide T1 (alcalis) oxydé puis réduit, sont de bons inhibiteurs du système T1/anti sérum Ra mais n'inhibent pas le système lipopolysaccharide T1/ antisérum T1 (figure II,3A et B).

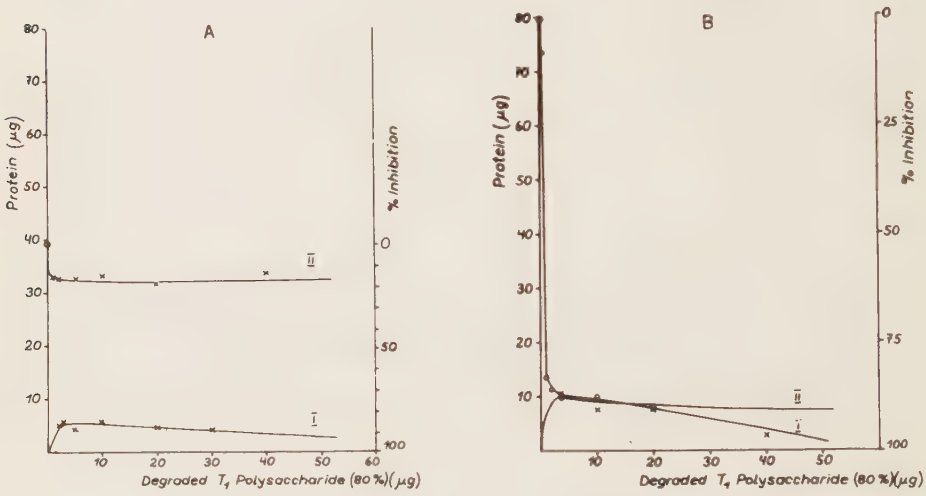


Figure II,3. (Précipitation et) inhibition de la précipitation du lipopolysaccharide T1 dans les séra anti T1 et Ra par le polysaccharide T1 dégradé. Des quantités croissantes de polysaccharide T1 dégradé (fraction précipitée par l'éthanol) sont incubées en présence de sérum anti T1 (3A) et anti Ra (3B). Après deux jours le précipité est analysé pour la présence de protéine (courbe I). A chaque surnageant on ajoute 30 µg de lipopolysaccharide T1 et on analyse les protéines dans le précipité formé (courbe II). (Wheat et al. 1967).

III. DISCUSSION

Il est admis en général , que les lipopolysaccharides des Salmonelles forme S (type sauvage) se composent d'un polysaccharide commun appelé "core" constitué des sucres de base suivants : KDO, L-glycéro-D-mannoheptose, D-galactose, D-glucose et N-acétyl-D-glucosamine. Les chaînes spécifiques qui varient selon l'espèce , sont rattachées au "core" (Lüderitz et al. 1966a ; Osborn et al.1964) Dans les dernières années des mutants R appartenant à différentes classes ont été isolés et étudiés (Beckmann et al. 1964b; Naide et al. 1965; Lüderitz et al. 1966a et b ; Osborn et al. 1964). Les lipopolysaccharides R se composent toujours de moins de sucres que ceux des Salmonelles de type sauvage. Ils sont bloqués dans la synthèse ou la possibilité de transférer certains sucres sur leur polysaccharide et pour cette raison synthétisent un lipopolysaccharide incomplet. Jusqu'ici on n'avait trouvé aucun lipopolysaccharide R composé de sucres différents du lipopolysaccharide S apparenté (Lüderitz et al. 1962b). Le lipopolysaccharide T1 est la seule exception puisqu'il contient 14 à 22 % de D-ribose absent dans la forme S. Ces lipopolysaccharides T1 renferment de plus une quantité équivalente de D-galactose.

Les préparations dégradées du lipopolysaccharide T1 contiennent également du D-ribose et du D-galactose en grande quantité , à coté des sucres caractéristiques du "core". Une oxydation periodique suivie d'une réduction de ces préparations a montré que le ribose n'était pas attaqué. Le galactose est détruit presque quantitativement. Après hydrolyse trois produits de dégradation ont pu être identifiés : le thréitol et l'arabinose (sans doute des produits de dégradation du galactose) et le mannose , provenant de la rupture entre les carbones C6 et C7 du L-glycéro-D-mannoheptose (selon Cherniak et Osborn 1966).

Dans une étape suivante il s'agissait de prouver que le ribose et le galactose sont liés de manière covalente au lipopolysaccharide de telle sorte qu'ils forment avec lui une molécule. C'est pourquoi nous avons fait des tests

sérologiques de précipitations quantitatives avec le lipopolysaccharide T1. Le ribose et le galactose ont pu être mis en évidence dans les précipités formés en présence de séra anti T1 et anti Ra . Ceci ne peut pourtant pas être considéré comme une preuve définitive de la présence du ribose et des autres sucres dans une seule et même molécule. Il a été démontré en effet que si un mélange artificiel de deux lipopolysaccharides sérologiquement différents peut être séparé par des méthodes sérologiques , un mélange de lipopolysaccharides obtenus par extraction d'un mélange de bactéries différentes ne peut être séparé par ces mêmes méthodes sérologiques (Ribi, Rudbach). Ces lipopolysaccharides coextraits forment des aggrégats (Sarvas et al. 1967). Ainsi si le ribose et le galactose forment un lipopolysaccharide indépendament et à coté du lipopolysaccharide formé par les autres sucres , il ne serait pas possible de les séparer par les méthodes utilisées. Cependant l'idée de la coexistance de deux lipopolysaccharides différents (l'un T1 et l'autre Ra) dans le mutant T1 semble peu probable. D'autre part si le ribose et le galactose forment des polymères solubles, on devrait les retrouver dans les fractions plus légères du surnageant (L1) après la purification par ultracentrifugation qui suit l'extraction au phénol:eau. Ceci est le cas , par exemple, des polysaccharides porteurs de la spécificité O (haptènes), des glucanes et d'autres polysaccharides ainsi séparés du lipopolysaccharide par ultracentrifugation (Beckmann et al. 1964b; Westphal et Jann 1965). Les (lipo)polysaccharides dégradés (acide ou alcalis) ne précipitent que faiblement en présence des séra anti T1 et anti Ra (tableau II,8 ; page 65). Si on admet que dans le lipopolysaccharide T1 d'origine le ribose et le galactose sont liés au polysaccharide du "core" ce doit être par une liaison acido- ou alcalis labile puisqu'après traitement par les alcalis ou un acide ces sucres sont rapidement libérés sous forme de polymères précipités par l'alcool mais non-précipitables par les anti séra et non-dialysables.

Le lipopolysaccharide T1 oxydé puis réduit donne un précipité avec les séra anti T1 et anti Ra comme dans le cas du lipopolysaccharide d'origine.Ceci montre que la destruction du galactose n'a pas d'influence sur la précipitabilité

du lipopolysaccharide T1 par l'antisérum spécifique. Les lipopolysaccharides T1 dégradés aux alcalis ne précipitent que la moitié d'anticorps T1 et Ra spécifiques , en comparaison avec le lipopolysaccharides T1 non dégradé. Les (lipo)polysaccharides T1 dégradés (acide ou alcalis) après oxydation par le periodate ne sont plus précipitables par aucun sérum (anti T1 ou anti Ra) . Ils inhibent par contre la précipitation de lipopolysaccharide T1 et Ra non oxydés dans le sérum anti Ra. Le fait que ces préparations n'inhibent pas la précipitation du lipopolysaccharide T1 dans le sérum anti T1 n'a pas encore pu être expliqué.

Des tests d'inhibition de la hemagglutination ont montré la similitude sérologique entre les (lipo)polysaccharides extraits de S.friedenau T1 , de S. minnesota Ra (R60) et de S.typhi murium Ra (TV 149). Une forte réaction croisée a été mise en évidence avec les lipopolysaccharides obtenus à partir d'autres espèces de Salmonelles et avec les antiséra obtenus avec d'autres mutants Ra (tableau II,7).Il faut remarquer ici que si la réaction croisée des séra anti T1 et du lipopolysaccharide de S.typhi murium TV 149 est significative, celle du lipopolysaccharide de S.minnesota Ra (R60) par contre ne l'est pas. En effet suivant les cas on a pu observer que ce mutant Ra synthétise un lipopolysaccharide contenant une certaine quantité de ribose et de galactose (supérieure à celle trouvée normalement dans le "core").

Une absorption croisée des séra avec des mutants provoque la disparition de l'anticorps homologue comme le montrent les tests d'hémagglutination. Les polysaccharides T1 dégradés inhibent le système Ra (tableau II,8; page 65) et l'un des systèmes T1 testés . On ne peut expliquer la différence de réaction entre les séra anti S.dessau T1 et anti S.friedenau T1

Le ribose, à forte concentration, inhibe les systèmes T1 et Ra (anti R60), tandis que le galactose reste inactif. Le groupement commun à ces lipopolysaccharides T1 et Ra reste inconnu à ce stade mais sera étudié plus loin. Il ne faut pas oublier que les tests d'hémagglutination sont réalisés à l'aide d'érythrocytes sensibilisés par des lipopolysaccharides traités aux alcalis. Des déterminants alcali-sensibles ne seront détectés que s'ils conservent leur spécificité et sont fixés à la surface des érythrocytes. C'est pourquoi s'il est vrai que le

traitement du lipopolysaccharide par la soude libère un polymère (ribose-galactose) sa spécificité ne sera exprimée que si celui-ci est fixé à la surface des erythrocytes. Certains séra anti Ra ne donnent pas de réactions croisées avec les lipopolysaccharides T1.

En résumé:

Les similitudes suivantes existent entre les mutants T1 et les mutants Ra : les lipopolysaccharides dégradés dérivant des lipopolysaccharides T1 et Ra renferment la glucosamine ce qui signifie que le "core" commun aux lipopolysaccharides des Salmonelles est intact (Lüderitz et al. 1966b). On pourrait s'attendre à ce que les mutants T1 par analogie avec les mutants Ra ne synthétisent pas de polysaccharides spécifiques des antigènes O. En effet on n'a pas pu retrouver de haptène O spécifique dans les surnageants (L1) après ultracentrifugation, mais un haptène T1 spécifique. Certains lipopolysaccharides Ra (S.minnesota R60) peuvent contenir jusqu'à 5% de ribose ne provenant pas d'acides nucléiques mais dont le rôle semble voisin de celui du ribose des lipopolysaccharides T1. Les lipopolysaccharides T1 et Ra donnent des réactions croisées quand on les teste dans différents systèmes sérologiques.

Il est possible que certains mutants Ra (S.minnesota R 60) renferment dans leur lipopolysaccharide des unités ribose-galactose simples qui sous l'influence d'un enzyme activé se présentent sous forme polymérisée dans l'antigène T1. C'est pourquoi dans la réaction avec le sérum anti S.minnesota Ra il existe peut être une contamination par des anticorps T1 spécifiques. La réaction entre S.typhi murium Ra (TV 149)et le sérum anti T1 (tableau II, 7) est , par contre, plus significative.

Ces résultats sont en accord avec ceux qui tendent à prouver que les mutants T1 sont des doubles mutants. Une mutation concerne la biosynthèse des chaines O-spécifiques, absentes dans les antigènes T1 ; la seconde serait due à l'activation d'un enzyme qui synthétiserait le polysaccharide ribose-galactose. Se basant sur ces conditions on a pu élaborer le schéma suivant , montrant un mécanisme possible pour la formation des formes T1 à partir des formes S :

Des mutants O,T1 portant les spécificités O et T1 où les formes Ra représentent des formes intermédiaires , ont pu être isolés. Des mutants O, T1 de S.weslaco ont été décrits par Schlosshardt en 1960. Des formes O, T1 ont été produites par recombinaison génétique par Sarvas et Mäkelä en 1965. S.abony 4,5,12 et S.montevideo 6,7 ont été croisés avec S.typhi murium T1 respectivement. Des hybrides portant les spécificités 4,5,12,T1 et 6,7,T1 ont pu être isolés, ce qui démontre que dans les recombinants O,T1 le locus O défectueux a été remplacé par le locus intact du donneur.

C H A P I T R E III

LIAISONS DES SUCRES CONSTITUTIFS DES LIPOPOLYSACCHARIDES T1

I. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent il a été montré que les lipopolysaccharides T1 se composent de 5 sucres constituant le "core" (KDO, heptose, glucosamine, glucose et galactose) et d'une quantité importante de D-ribose et de D-galactose. Jusqu'ici les études structurales dans le domaine des polysaccharides naturels avaient surtout été réalisées à l'aide d'analyses chimiques ou immunologiques de fragments obtenus après hydrolyse partielle. Récemment la chromatographie en phase gazeuse est devenue une méthode complémentaire importante. Elle doit être réalisée sur des dérivés volatils des sucres. On avait fait appel aux sucres acétylés, aux éthers triméthylsilylés ou aux méthyl glycosides des sucres; dans ces cas on obtenait de 2 à 4 pics par sucre (α, ß, pyranose et furanose). Ceci rendait l'identification particulièrement difficile dans le cas d'hétéropolysaccharides. Cette difficulté a pu être contournée en opérant sur des sucres réduits. Un grand progrès a été apporté dans la détermination quantitative des sucres quand les acétates d'alditols ont été utilisés dans l'analyse des dérivés méthylés. Dans ce cas les sucres, partiellement méthylés et hydrolysés, sont réduits et acétylés. L'introduction de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrographie de masse a représenté une nouvelle étape importante dans l'étude des polysaccharides après méthylation. Un point important est à relever ici: Après réduction des sucres la reconnaissance de la séquence des atomes de carbone n'est plus possible. La réduction par le borodeutérure de sodium marquant le carbone C1, a permis d'éliminer cette difficulté. Ces méthodes ont été mises au point par B. Lindberg et son équipe (Stockholm). Nous les avons adoptées dans l'étude des liaisons des sucres présents dans les lipopolysaccharides de S.friedenau T1 et d'autres mutants T1.

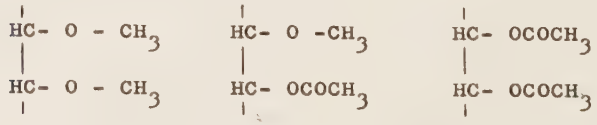
Un mélange de sucres partiellement méthylés et acétylés a pu être séparé par chromatographie en phase

gazeuse sur une colonne ECNSS-M, et les dérivés directement introduits dans la chambre à ionisation d'un spectrographe de masse couplé avec le chromatographe.

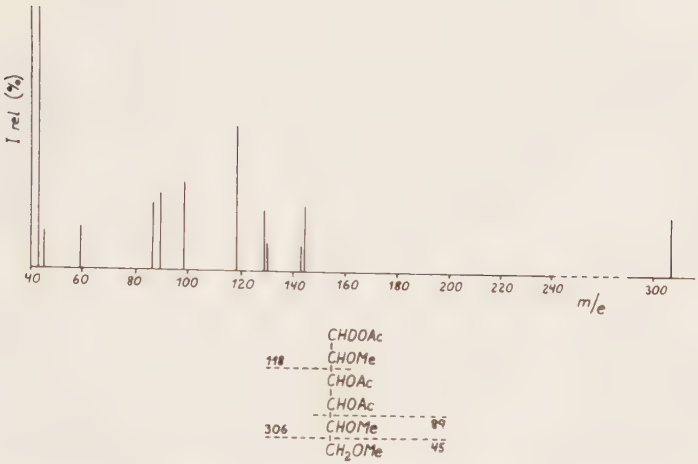
Dans tous les spectres le pic de masse m/e 43 (CH_3CO^+) a été choisi comme pic de base. Seuls les pics ayant une intensité d'au moins 10% du pic de base ont été retenus et analysés. Les spectres de masse d'alditols isomères présentant la même distribution des substituants sont impossibles à différencier. Ainsi par exemple les alditols acétylés dérivés de 2,3 ou 3,4-di-O-méthyl-pentoses donnent des fragments de masses identiques. En réduisant les sucres méthylés par le borodeutérure de sodium avant acétylation cet inconvénient peut être éliminé. En effet il y aura un atome de deutérium sur le carbone C1 de chaque sucre ce qui permet de le distinguer du carbone terminal C5 ou C6. Les fragments contenant C1 présentent une masse m+1 par rapport à la masse m du fragment non deutéré.

En combinant la chromatographie en phase gazeuse (mesure des temps de rétention) et la spectrographie de masse, on peut obtenir une bonne caractérisation. La figure III,1 donne le schéma d'un spectre de masse et du sucre qui lui correspond.

Dans leur étude des dérivés acétates d'alditols, Chizhov et al.(1966) ont montré qu'il fallait faire une distinction entre les fragments primaires (dus à la coupure entre deux atomes de carbone) et les fragments secondaires formés à partir des précédents par élimination d'acide acétique (60) et/ou de cétène (42). La hauteur des pics dus aux fragments primaires est inversement proportionnelle à leur masse. Dans le cas des acétates d'alditols partiellement méthylés trois possibilités peuvent se présenter: (1,2,3)



(1) (2) (3)

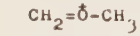
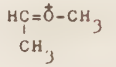
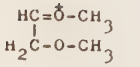
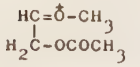
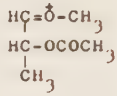
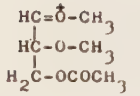
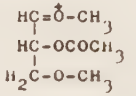
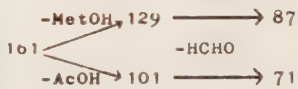
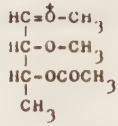
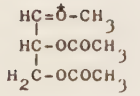
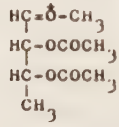
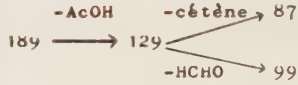
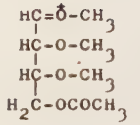
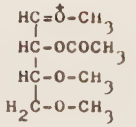
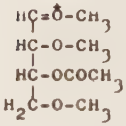
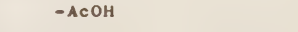
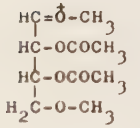
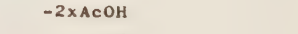
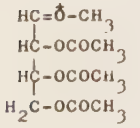


Spectre de masse d'un 1,3,4-Tri-O-acetyl-2,5,6-Tri-O-methyl-hexitol

Figure III,1. Schéma du spectre de masse d'un 1,3,4-tri-O-acétyl-2,5,6-tri-O-méthyl-hexitol et de la fragmentation d'un tel dérivé.

Björndal et al. (1967b) ont montré que la coupure se produit entre les carbones des structures (1) et (2) de préférence à ceux de la structure (3). La charge positive est stabilisée par le groupement méthoxyl. On rencontre peu de fragments contenant des groupements méthoxyl voisins; ceci indique que la structure (1) est scindée de préférence à la structure (2). Les fragments secondaires dérivent des fragments primaires par éliminations simples ou consécutives d'acide acétique (60), de cétène (42), méthanol (32) ou de formaldéhyde (30). Le tableau III,1 montre les principaux fragments primaires, obtenus à partir d'alditols méthylés et acétylés, et les fragments secondaires qui en dérivent.

Tableau III,1. Fragments primaires et secondaires obtenus à partir d'alditols méthylés et acétylés.

Principaux fragments primaires obtenus à partir d'alditols méthylés et acétylés	m/e	Principaux fragments secondaires
 		
		
 		
 	161	
	175	
 	189 203	
  	205	
	233	
	261	

II. RESULTATS

A) Analyse du lipopolysaccharide T1

Le lipopolysaccharide a été extrait des parois de S.friedenau T1 selon la méthode de Westphal et Jann (1965). Les sucres ont été estimés quantitativement par chromatographie en phase gazeuse des acétates d'alditols. Les proportions molaires relatives identifiées, sont les suivantes: D-ribose, D-galactose, D-glucose et L-glycéro-D-mannoheptose 38:48:8:6.

Les spectres infra-rouges montrent une bande d'absorption à 1735 cm^{-1} qui est due en général aux esters présents dans le lipoide A mais qui peut être aussi une indication de la présence de groupements O-acétyl. Après traitement du lipopolysaccharide T1 par le méthanol-chlorhydrique 4% (30 minutes, 100°C) on n'a pu détecter aucune trace d'acétate de méthyle par chromatographie en phase gazeuse. Ceci montre l'absence de groupements O-acétyl. Une autre expérience confirme l'absence de groupements O-acétyl dans le lipopolysaccharide T1. Il s'agit de la méthylation du lipopolysaccharide T1 après acétylation (Hellerqvist et al. 1968). Cette méthode permet en même temps de localiser les groupements O-acétyl dans les polysaccharides (voir page 44)

B) Analyse de polysaccharides T1 dégradés (page 32)

Le polysaccharide T1 dégradé par l'acide acétique (1 g) dissous dans l'eau a été fractionné sur colonne de Sephadex G 200 (2 cm de diamètre, 60 cm de hauteur). Dans ce cas nous avons voulu juger de l'homogénéité des chaînes dépourvues de lipoide A. Les échantillons récoltés (4 ml) sont analysés pour la présence de pentoses (orcinol-chlorhydrique) et de heptose (cystéine-sulfurique). Les échantillons 30 à 47 riches en ribose, 52 à 57 riches en heptose, sont réunis pour donner les fractions F1 (623 mg) et F3 (41 mg). Les échantillons intermédiaires (48 à 51) ont donné la fraction F2 (38 mg). La figure III,2 donne le diagramme d'élution du polysaccharide dégradé sur la colonne de Sephadex G 200.

Tableau III,2 Proportions relatives molaires des constituants de lipopolysaccharide T1 et de polysaccharides dégradés T1.

Echantillons	Ribose	galactose	glucose	heptose	threitol	arabinose	mannose
	mole %	mole %	mole %	mole %	mole %	mole %	mole %
Lipopolysaccharide T1	38	48	8	6			
Polysaccharide dégradé brut	36	45	11	8			
Fraction F1	43	49	5	3			
Fraction F1 après traitement par IO_4^-/BH_4^-	53	5	3	0	13	25	1
Fraction F3	6	38	29	27			

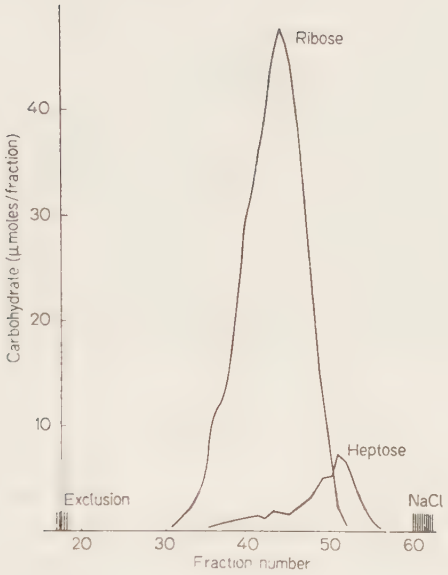


Figure III,2. Fractionnement sur Sephadex G 200 des polysaccharides obtenus après hydrolyse ménagée du lipopolysaccharide T1 de S.friedenau T1 (Berst et al. 1969).

La fraction principale F1 représente le polysaccharide T1. Comme le montre le tableau III,2 elle est constituée surtout de D-ribose et de D-galactose avec en plus de petites quantités des sucres du polysaccharide du "core".

La fraction F3 est constituée essentiellement par les sucres du polysaccharide du "core", c'est à dire KDO, heptose, glucose, galactose et glucosamine. La fraction F2 est un mélange de F1 et F3. Les sucres de ces polysaccharides dégradés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse de leurs acétates d'alditols. On a trouvé

les proportions molaires relatives suivantes pour le ribose, galactose, glucose, heptose, 36:45:11:8, pour le polysaccharide dégradé brut, 43:49:5:3 pour la fraction F1, et 6:38:29:27 pour la fraction F3 (tableau III,2).

C) Méthylation du lipopolysaccharide T1

Pour mettre en évidence le mode de liaisons des sucres le lipopolysaccharide T1 a été méthylé selon le procédé de Hakomori (1964), puis réduit, acétylé et analysé par chromatographie en phase gazeuse et spectrographie de masse (Björndal et al. 1967 a et b).

La figure III,3 montre un chromatogramme typique obtenu à partir d'un lipopolysaccharide T1 méthylé et acétylé.

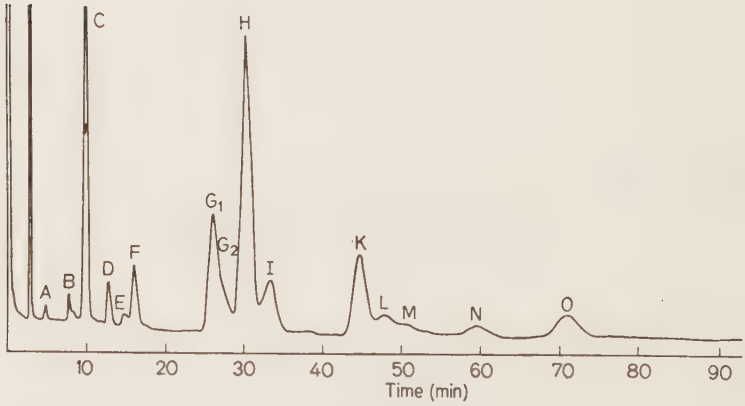


Figure III,3. Chromatogramme en phase gazeuse des sucres méthylés sous forme de leurs acétates d'alditols, obtenus après hydrolyse du lipopolysaccharide T1 méthylé. (Berst et al. 1969)

Les spectres de masse ont été pris au début, au maximum et à la fin des grands pics, et au maximum des pics plus petits.

Le tableau III,3 résume les résultats quantitatifs obtenus après méthylation du lipopolysaccharide T1.

Le spectre de masse du composant du pic A (T=0,40 par rapport au 1,5-di-O-acétyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose) est identique à celui obtenu à partir de l'alditol acétylé du 2,3,5-tri-O-méthyl-L-arabinose. Le ribose étant le seul pentose trouvé dans le lipopolysaccharide T1, ce composant peut être considéré comme étant dérivé du 2,3,5-tri-O-méthyl-D-ribose.

Le composant du pic B n'a pu être identifié comme un sucre méthylé à partir de son spectre de masse; il n'a pas été étudié plus attentivement. Le composant du pic C (T= 0,80) a donné des pics importants de masse m/e 45, 161 et 190. Ceux-ci sont des fragments primaires typiques des alditols acétylés dérivés d'un 3,5-di-O-méthyl-pentose (Fig. III,4a). Pour les mêmes raisons déjà citées pour le pic A, ce composant doit être dérivé du 3,5-di-O-méthyl-D-ribose.

Les composants des pics D (T=1,00), E (T=1,15) et F (T=1,25) ont été identifiés d'après leurs temps de rétention et d'après leurs spectres de masse comme des dérivés du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose, du 2,3,5,6-tétra-O-méthyl-D-galactose et du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactose, respectivement.

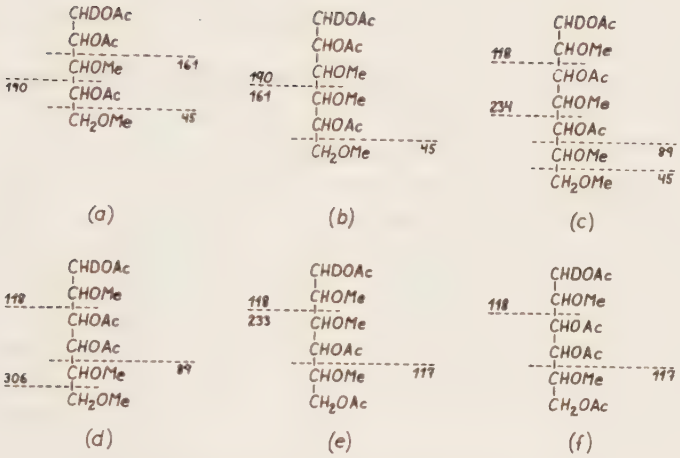
Le spectre de masse du pic G (T environ 2) a montré, entre autres, des fragments de m/e 118 et 190. Ceux-ci doivent provenir des carbones C1 et C2 d'un alditol acétate méthylé en C2 (Fig. III,4c) et des carbones C1, C2 et C3 d'un fragment méthylé en C3 mais non en C2 (Fig. III,4b). Ceci indique la présence d'au moins deux constituants dans ce pic G. L'un d'entre eux G2 (partie descendante du pic G) pourrait être l'alditol acétate dérivant du 3,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose (T= 1,98). Ce composant est sans doute dérivé du polysaccharide méthylé provenant du "core" des lipopolysaccharides de Salmonelles.

Il est évident que G1 malgré un pic important pour m/e 89 n'est pas dérivé d'un galactofuranose dont les fragments primaires (m/e 306 et 205) contenant C1 à C5

Tableau III,3 Méthyl ethers des sucres obtenus à partir de l'hydrolysat du lipopolysaccharide T1 méthylé

Sucre	Pic	T[a]		origine des sucres
			mole %	
2,3,5-Tri-O-Me-D-ribose	A	0,40	1,8	chaine T1 spécifique
3,5-Di-O-Me-D-ribose	C	0,77	35,3	chaine T1 spécifique
2,3,4,6-Tetra-O-Me-D-glucose	D	1,00	1,8	
2,3,5,6-Tetra-O-Me-D-galactose	E	1,15	0,9	chaine T1 spécifique
2,3,4,6-Tetra-O-Me-D-galactose	F	1,25	1,8	polysaccharide du "core"
Inconnu	G_1	1,95	(7,2)	
3,4,6-Tri-O-Me-D-glucose	G_2	1,98	(2,4)	polysaccharide du "core"
2,5,6-Tri-O-Me-D-galactose	H	2,25	28,8	chaine T1 spécifique
3,4,6-Tri-O-Me-D-galactose	I	2,48	2,5	polysaccharide du "core"
2,3,5-Tri-O-Me-D-galactose	K	3,28	8,6	chaine T1 spécifique
2,6-Di-O-Me-D-galactose	L	3,62	2,4	
2,5-Di-O-Me-D-galactose	M	3,70	1,2	chaine T1 spécifique
3,6-Di-O-Me-D-glucose	N	4,30	0,9	polysaccharide du "core"
2,4-Di-O-Me-D-glucose	O	5,10	3,50	polysaccharide du "core"

a) Temps de rétention des alditols acetates sur une colonne ECNSS-M, se rapportant au 1,5-Di-O-acétyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucitol



Fragments primaires de quelques alditols acetates méthylés

Figure III,4 Fragments primaires, comme on peut les prévoir pour les principaux alditols acétates méthylés.

et C3 à C6 respectivement, n'ont pu être observés. Un dérivé de 2,4,6,7-tétra-O-méthyl-heptose provenant du "core" pourrait être une autre possibilité. Dans ce cas (Figure III,4c) la présence d'un fragment m/e 264 ne peut être expliqué et le pic correspondant à un autre fragment m/e 234 est beaucoup trop peu intense. C'est pourquoi ce composant G1 reste, en attendant non-identifié. Le composant du pic H (T= 2,25) donnent d'importants fragments m/e 45, 89, 118 et 306, ce qui correspond à un acétate d'alditol dérivant d'un 2,5,6-tri-O-méthyl-hexose (Figure III,4d). A cause de la proportion importante de ce constituant ce ne peut être qu'un dérivé du galactose. En effet le galactose est, à coté du ribose, l'un des composant les plus importants dans le lipopolysaccharide T1.

Quand on se base sur son temps de rétention (T=2,48) et son spectre de masse, le composant du pic I a pu être identifié comme étant l'alditol acétate dérivé du 3,4,6--tri-O-méthyl-D-galactose, autre constituant du polysaccharide du "core".

Le composant du pic K (T= 3,28) donne le même temps de rétention et le même spectre de masse que l'alditol acétylé dérivé du 2,3,5-tri-O-méthyl-D-galactose. Le glucose de référence correspondant n'était pas disponible, mais à cause de la grande quantité de ce composant, on peut supposer que c'est un dérivé du D-galactose T1-spécifique. Le composant du pic L identifié grâce à son temps de rétention (T= 3,62) et son spectre de masse est un alditol acétylé dérivé du 2,6-di-O-méthyl-D-galactose.

Le composant du pic M (T= 3,70) avec les fragments m/e 117 et 118 dérive d'un 2,5-di-O-méthyl-hexose (Figure III, 4e). Il n'y avait pas de sucre de référence dans ce cas mais toutes les hexose sous forme furanose mis en évidence dans ce lipopolysaccharide T1 provenaient du D-galactose. On admet qu'il s'agit ici du 2,5-di-O-méthyl--D-galactose.

Le composant du pic N (T= 4,30) par son spectre de masse et son temps de rétention, pourrait être aussi bien un dérivé du 3,6-di-O-méthyl-D-glucose (T= 4,40) que du 3,6-di-O-méthyl-D-galactose (T= 4,30).D'après la faible quantité mise en évidence ce composant pourrait provenir du "core" et dans ce cas, comme le suggère Nikaido (1969), ce ne peut être que le dérivé du D-glucose.

Le composant du pic O (T= 5,10) est dérivé du 2,4--di-O-méthyl-D-glucose (originaire du "core") comme l'indiquent son temps de rétention et son spectre de masse .

Le tableau III,4 résume les principaux fragments primaires et secondaires apparus sur les spectres de masse des alditols méthylés et acétylés provenant du lipopolysaccharide T1.

Les proportions molaires relatives calculées à partir des constituants méthylés du lipopolysaccharide

Principaux pics (m/e) des spectres de masses des alditols methylés des lipopolysaccharide de S.friedenau T1

dérivés des sucres \ m/e	43	45*	59	71	87	88**	89	90	99	100	101	102	113	117	118	129	130	144	145	161	162	189	190	205	233	306
2,3,5-Me_3-Ri	+	+		+	+						+	+			+	+				+						
3,5-Me_2-Ri	+	+		+	+	+					+					+	+			+			+			
2,3,4,6-Me_4-Glu	+	+		+							+	+			+	+			+	+	+			+		
2,3,5,6-Me_4-Gal	+	+	+				+					+			+				(+)		+			(+)		
2,3,4,6-Me_4-Gal	+	+		+							+	+			+	+			+	+	+			+		
3,4,6-Me_3-Glu	+	+			+	+				+	+					+	+			+			+			
2,5,6-Me_3-Gal	+	+	+		+		+								+	+	+	+								+
3,4,6-Me_3-Gal	+	+			+	+				+	+					+	+			+			+			
2,3,5-Me_3-Gal	+											+		+	+										(+)	
2,5-Me_2-Gal	+													+	+											
2,6-Me_2-Gal	+	+			+										+	+										
3,6-Me_2-Glu	+	+			+	+			+				+				+						+		+	
2,4-Me_2-Glu	+				+										+	+						+				

* les masses soulignées représentent des fragments primaires

** les masses de la rangée supérieure représentent les fragments comportant le carbone réducteur C1 du dérivé méthylé augmenté d'une unité (deutérium)

T1 confirment celles déjà trouvées dans l'analyse des alditols acétylés (tableau 2 et 3): D-ribose, D-galactose et D-glucose de 37:47:8. Les 7% qui manquent proviennent du composant non-identifié (Tableau III,5).

Tableau III,5. Comparaison entre les proportions molaires relatives obtenues après acétylation seuls et après méthylation du lipopolysaccharide T1

Echantillons	Rib mole%	Gal mole%	Glc mole%	Hep mole%	Inconnu %
Acétates d'alditols du lipopolysaccharide T1	38	48	8	6	
Dérivés méthylés et acétylés du lipopolysaccharide T1	37	47	8	-	7

En résumé:

Nous avons pu mettre en évidence:

1) Les sucres du pentasaccharide du "core" identifiés dans plusieurs Salmonelles: galactopyranoside terminal, galactopyranoside substitué en C2, glucopyranoside substitué en C3 et C6, glucopyranoside substitué en C2 et glucopyranoside substitué en C2 et C4.

2) Les sucres T1 spécifiques: ribofuranoside terminal (en faible quantité), ribofuranoside substitué en C2, galactofuranoside terminal (faible quantité), galactofuranosides substitués en C3 ou en C6 et galactofuranoside substitué en C3 et C6 (faible quantité).

D'après les valeurs quantitatives la participation des sucres du "core" est d'environ 20% contre 80% pour les sucres T1-spécifiques.

D) Variation du pouvoir rotatoire du polysaccharide T1 dégradé pendant une hydrolyse ménagée

Cette étude nous donne une idée de la nature des

liaisons (α ou β) dans le lipopolysaccharide T1.

Il est impossible de suivre la variation du pouvoir rotatoire du lipopolysaccharide T1 lors d'une hydrolyse acide, car le lipoide A précipite et rend les mesures difficiles. C'est pourquoi la fraction F1 du polysaccharide dégradé T1 a été utilisée dans cette étude.

En solution dans l'eau distillée la fraction F1 a un pouvoir rotatoire négatif ($[\alpha]^{80}_{5780} = -75^{o}$). Une hydrolyse en présence d'acide sulfurique 0,125N à 80°C montre une croissance très rapide ($[\alpha]^{80}_{5780} = -20^{o}$) puis après 6 heures d'hydrolyse une croissance plus lente du pouvoir rotatoire ($[\alpha]^{80}_{5780} = +27^{o}$, après 27 heures d'hydrolyse) comme le montre la figure III,5.

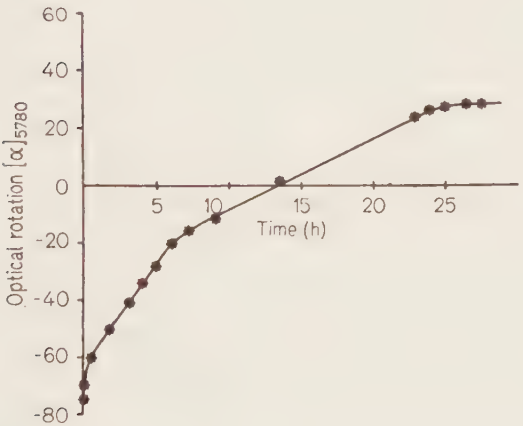


Figure III,5. Variation du pouvoir rotatoire lors d'une hydrolyse ménagée du polysaccharide dégradé (fraction F1) de S.friedenau T1 (Berst et al. 1969)

Les résidus de ribo- et de galactofuranosides étant les constituants les plus importants du lipopolysaccharide T1, leur rôle sera prédominant dans la variation du pouvoir rotatoire. Celui-ci sera essentiellement dépendant du ribose et du galactose libres. D'après les valeurs

Tableau III,6 Pouvoir rotatoire de quelques substances de référence

(Augestad et Berner 1954, Stanék et al. 1963)

Glycosides et sucres libres	Solvant	Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$
Méthyl-α-D-galactofuranoside	eau	+ 104°
Méthyl-ß-D-galactofuranoside	eau	- 112°
D-Galactose	eau	+ 80° (équilibre)
Méthyl-α-D-ribofuranoside	methanol	+ 140°
Méthyl-ß-D-ribofuranoside	methanol	- 62°4
D-Ribose	eau	- 23°7 (équilibre)

connues des pouvoirs rotatoires des glycosides correspondants et des sucres libres, (tableau III1,5), et en tenant compte de la teneur en ribofuranosides (38%) et en galactofuranosides (environ 40%), nous avons admis que ces derniers forment des liaisons ß dans les lipopolysaccharides T1.

E) Analyse des polysaccharides T1 oxydés et puis réduits

En tenant compte des résultats de l'analyse des dérivés méthylés du lipopolysaccharide T1, on peut s'attendre à ce que l'oxydation périodique n'attaque pas (ou peu) le ribose mais détruise presque quantitativement le galactofuranose avec formation de thréitol et d'arabinose. Ces sucres ont été identifiés dans le chapitre III lors d'une rapide analyse du lipopolysaccharide T1 oxydé et réduit. Une étude quantitative des produits de dégradation peut encore confirmer les résultats de la méthylation.

Le polysaccharide dégradé (fraction F1) a été oxydé et réduit et hydrolysé (H_2SO_4 0,5N, 100°C, 1 ou 12 heures). Les proportions molaires relatives ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse des dérivés acétates d'alditols. Les constituants suivants ont pu être identifiés: D-ribose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-mannose et thréitol. Les proportions molaires relatives sont de 53:5:3:25:1:13 comme le montre le tableau III,2. La figure III,6 montre les chromatogrammes comparatifs des constituants (acétates d'alditols) des polysaccharides avant et après oxydation/réduction.

Comme prévu le ribose se retrouve inchangé. Le thréitol dérive des résidus de galactofuranose substitués en position C6, l'arabinose des résidus de galactofuranose substitués en position C3 et le mannose du L-glycéro-D-manno-heptose substitué en position C3 (présent dans le "core". Les petites quantités de glucose et de galactose proviennent sans doute du "core" et du galactofuranoside substitué en C3, C6 (Figure III,7). Il faut noter ici qu'après 60 minutes d'hydrolyse, seule une faible

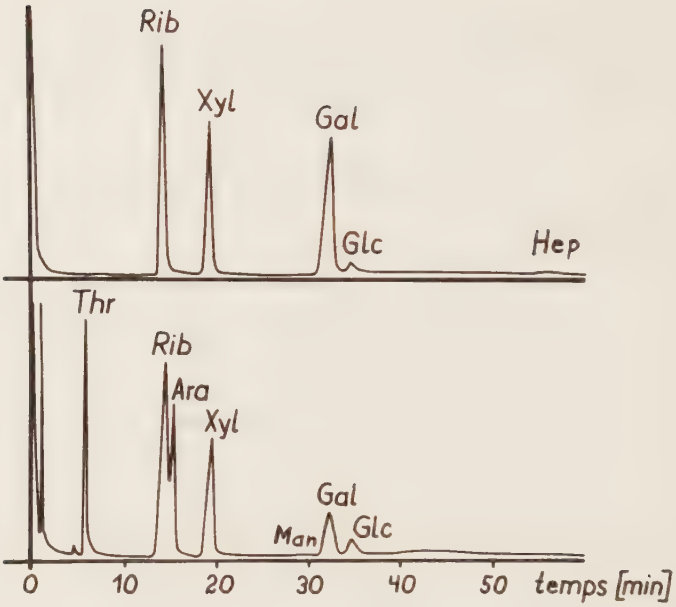


Figure III,6. Chromatogrammes comparant les constituants (acétates d'alditols) des polysaccharides T1 avant et après oxydation et réduction. Les polysaccharides ont été hydrolysés 60 minutes à 100°C par l'acide sulfurique 0,5N. Le dérivé acétylé du xylose a servi de témoin interne.

proportion d'hexopyranosides sont libérés.

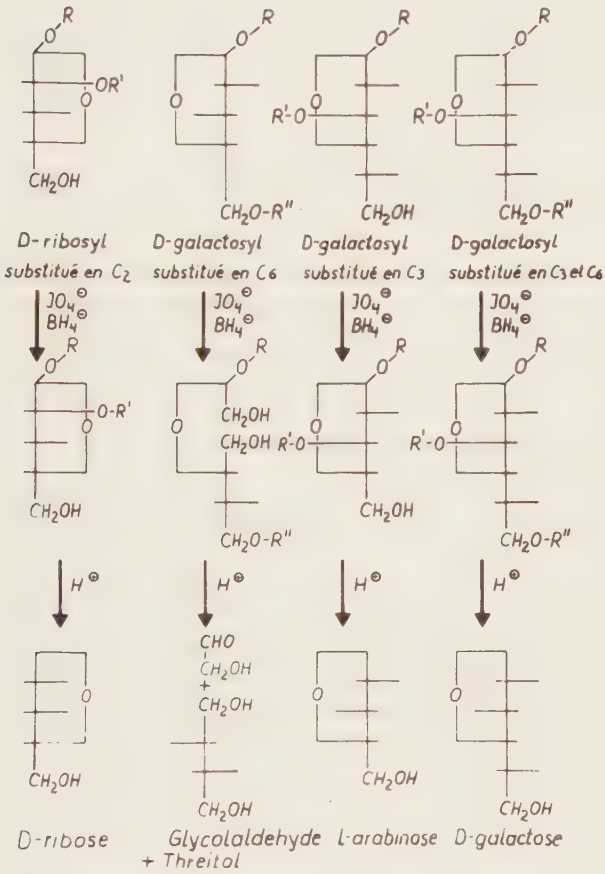


Figure III,7. Schéma des fragments obtenus après oxydation, réduction et hydrolyse du lipopolysaccharide T1.

F) Analyse des sucres de différents lipopolysaccharides T1

On a analysé par chromatographie en phase gazeuse la composition qualitative et quantitative des sucres de lipopolysaccharides de différentes origines: S.paratyphi B T1, S.dessau T1, S.typhi murium T1 et S.friedenau T1.

Tableau III,7 Proportions molaires relatives de lipopolysaccharides T1 d'origines différentes.

Echantillons	Ribose mole %	Galactose mole %	Glucose mole %	Heptose mole %
S. paratyphi B T1	55	30,5	8,5	6,0
S. dessau T1	17	63,5	11,5	8,0
S. typhi murium T1	28,5	46,5	13,0	12,0
S. friedenau T1	38	48,0	8,0	6,0

Comme le montre le tableau III,7 ces lipopolysaccharides sont composés des mêmes sucres. Le glucose et l'heptose sont présents en quantités comparables. Le ribose et le galactose, par contre, varient suivant l'espèce considérée. Cette méthode de dosage ne permet pas de différencier le galactose T1-spécifique du galactose du "core". Le rapport glucose:galactose dans le "core" est de 1:1, c'est pourquoi si nous retirons à la quantité totale de galactose une quantité équivalant à celle du glucose nous pouvons admettre que cette valeur correspond au galactose T1-spécifique. Ainsi S.friedenau T1 et S.typhi murium T1 présentent des proportions comparables. Les sucres du "core" (glucose et heptose) se trouvent en quantités légèrement supérieures dans le lipopolysaccharide de S.typhi murium T1. En tenant compte du galactose contenu dans le polysaccharide du "core" (même quantité que celle du glucose) la proportion ribose (T1):galactose (T1) est d'environ 1:1 pour ces deux lipopolysaccharides. Dans ceux de S.paratyphi S T1 et S.dessau T1 ces proportions sont de 2:1 et de 1:3 respectivement.

Une étude grossière des lipopolysaccharides T1 méthylés de ces différentes espèces a permis de confirmer l'identité qualitative de leurs dérivés méthylés. La seule différence réside dans les proportions relatives ribose : galactose. Le rapport du galactose lié en C3 sur galactose lié en C6 est le même pour les quatre lipopolysaccharides T1 analysés.

III. DISCUSSION

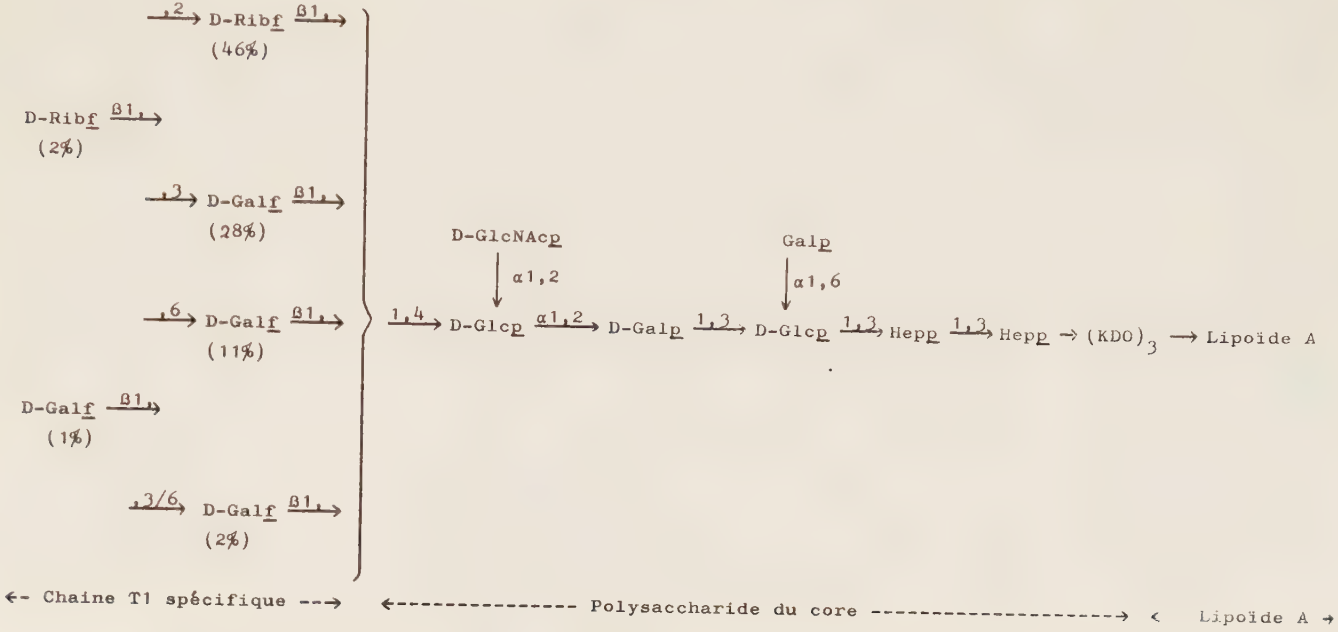
Les analyses après méthylation ont été réalisées sur le lipopolysaccharide extrait des parois de S.friedenau T1 par le mélange homogène phénol:eau. Nous avons pu mettre en évidence qu'environ 80% des sucres méthylés sont représentés par le galactose et le ribose sous forme furanosidique. Ces furanosides représentent certainement les éléments constitutifs des chaînes T1-spécifiques du lipopolysaccharide T1 Ces résultats confirment ceux de l'analyse quantitative. On a ainsi pu mettre en évidence des quantités équivalentes de ribofuranosides liés par le carbone C2 et de galactofuranosides liés en C3 et en C6 (figure III,8).

L'identification de faibles quantités de 2,5-di-O-méthyl-D-galactose indique la présence de peu de branchements. Le 2,3,5-tri-O-méthyl-D-ribose et le 2,3,5,6-tétra-O-méthyl-D-galactose sont des sucres terminaux de la chaîne T1 . La proportion furanosides terminaux à furanosides substitués est d'environ 1:40 pour le galactose et de 1:20 pour le ribose . Les proportions furanosides terminaux à furanosides disubstitués sont équivalentes.

Ces résultats sont confirmés par l'étude du lipopolysaccharide T1 oxydé puis réduit. La résistance du ribose s'explique par le cycle furanosidique et la substitution en C2.

Arabinose et thréitol sont deux produits de dégradation prévus pour les galactofuranosides substitués en C3 et en C6 respectivement . La formation de mannose est due à la présence de L-glycéro-D-mannoheptose dans le poly-

Figure III,8 Représentation schématique de la structure d'un lipopolysaccharide T1.
Pour la structure du core voir la référence Lüderitz et al. 1968.
Les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage relatif (mole %)
des sucres T1-spécifiques calculés à partir du tableau III, 3



saccharide du "core" (Dröge et al. 1968).

La variation du pouvoir rotatoire lors d'une hydrolyse ménagée du polysaccharide T1 a montré que les restes de ribofuranose et de galactofuranose sont probablement liés ß-glycosidiquement dans les chaînes T1-spécifiques.

Il est reconnu que les chaînes O-spécifiques se composent en général d'unités de répétition constituées par 3 à 6 unités de sucres (Lüderitz et al.1968). Ces résultats ne permettent pas de voir si les chaînes T1-spécifiques sont construites de manière analogue. La possibilité de l'existence d'unités de répétition classiques (3 à 6 sucres par unité) n'est pas compatible avec les résultats obtenus après méthylation. De plus les différences trouvées entre les proportions ribose:galactose dans les lipopolysaccharides extraits de divers mutants T1 , ne concordent pas non plus avec l'image classique des unités répétées des chaînes O-spécifiques. Il pourrait y avoir une répétition dans la partie galactose, car on retrouve dans les quatre cas étudiés les mêmes proportions pour les galactofuranosides liés en C3 et en C6. On pourrait penser que l'une des transférases participant à la biosynthèse, ait une spécificité réduite et forme des liaisons soit en C3 soit en C6 du galactofuranose, avec une préférence pour C3. Le fait que les mutants T1 qui ont un défaut dans le locus rfa, (rft1$^+$, rfa$^-$) synthétisent un haptène T1-spécifique , prouve que ces chaînes sont synthétisées dans les cellules bactériennes de la même manière que les chaînes O-spécifiques par l'intermédiaire d'un lipide transporteur (ACL: antigen carrier lipid),(Nikaido 1968; Sarvas, communication personnelle).

L'analyse de lipopolysaccharides T1 obtenus à partir de sources différentes soit de S.friedenau , de S.paratyphi B soit de S.dessau,a montré qu'ils renferment tous les mêmes sucres constitutifs mais dans des proportions différentes. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le principe même de la biosynthèse et la structure ne sont pas les mêmes pour les chaînes T1- et O-spécifiques.

A coté des sucres spécifiques pour le lipopolysaccharide T1 , l'analyse des produits méthylés a révélé la présence en quantité moindre des sucres originaires du "core" commun à tous les lipopolysaccharides des Salmonelles, c'est à dire du 2,3,4,6,tétra-O-méthyl-D-galactose, du 3,4,6,tri-O-méthyl-D-glucose , du 3,4,6-tri-O-méthyl-D-galactose, du 2,4-di-O-méthyl-D-glucose et très probablement du 3,6-di-O-méthyl-D-glucose; à ces derniers il faut ajouter le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose et le 2,6-di-O-méthyl-galactose . Un composé non identifié (G1) pourrait provenir du heptose. Les mêmes sucres méthylés ont été mis en évidence dans les lipopolysaccharides de diverses formes S des Salmonelles (Hellerqvist et al. 1969) et sont sans doute dérivés du polysaccharide du "core". Les 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose et 2,6-di-O-méthyl-galactose mis à part , ces dérivés du glucose et du galactose sont ceux qui devraient être théoriquement formés à partir du polysaccharide du"core", (Lüderitz et al. 1968; Osborn et al. 1964; Hämmerling et al. 1970).

La présence de glucose 2,4-substitué suggère la possibilité du rattachement du polysaccharide T1 au "core" par l'intermédiaire de ce glucose (liaison 1⟶ 4) comme il a été observé dans le cas des chaînes O-spécifiques (Nikaido 1969). Par contre la présence du glucose 2-substitué montre que certains tronçons du polysaccharide du "core" ne sont pas liés à des chaînes T1. Environ deux sur trois seraient libres dans le cas du lipopolysaccharide de S.friedenau T1.

Ces résultats confirment ceux du chapitre II où les réactions croisées entre les sérogroupes T1 et Ra sont dues probablement aux tronçons du "core" non substitués par des chaînes T1-spécifiques et libres de réagir avec les anticorps Ra-spécifiques.

Une autre confirmation est donnée par le fractionnement sur colonne de Sephadex G 200 des produits de dégradation du lipopolysaccharide T1. Deux fractions ont été éluées: la première,avec le front du solvant, peut être considérée comme la chaîne spécifique de l'antigène T1 reliée au "core" ; la seconde fraction est constituée par le polysaccharide du "core" seul. Cette dernière fraction ne

provient pas d'une contamination des cultures due à une reversion des bactéries T1 en Ra , car on n'a pas pu isoler de lipopolysaccharide Ra par extraction au mélange phénol-chloroforme-éther de pétrole. Ce solvant extrait sélectivement les lipopolysaccharides des mutants Ra (Galanos et al. 1969). Ceci indiquerait d'autre part la présence , entre les chaînes lipopolysaccharidiques, de liaisons ou de ponts phosphates, qui réuniraient un certain nombre de chaînes rompues après une hydrolyse ménagée. Cette hypothèse est confirmée par les résultats et suggestions de Müller-Seitz et al. (1968) et de Schmidt et al. (1969).

Dans les lipopolysaccharides T1 les chaînes spécifiques de la souche d'origine sont remplacées par des chaînes T1-spécifiques, composées de D-ribo-et D-galactofuranosides et reliées au "core" par son glucose subterminal.

Le D-galactofuranose est un monosaccharide qui a été rarement identifié dans la nature. Pourtant ces dernières années il a été mis en évidence dans certains Pneumocoques (Roberts et al. 1963; Rao et al. 1966; Watson et al. 1969). D'autres micro-organismes produisent le résidu galactofuranosyl comme Mycoplasma mycoides (Plackett et Butter 1964), Gibberella fujikuroi (Siddiqui et Adams 1961), Peltigera horizontalis (Lindberg et al. 1964), Bacteroides symbiosus (Reeves et al. 1964), Penicillium chrysogenum (Myazaki 1969).

Le ribose est lui aussi très rarement trouvé dans les polysaccharides naturels . Seulement récemment il a pu être mis en évidence dans certains lipopolysaccharides de Salmonelles et de Escherichia Coli . Il faut remarquer que des polysaccharides contenant du ribose en combinaison avec du galactose ou du rhamnose ,ont été trouvés dans une Klebsiella (O-4) par Nimmich (1969). Le lipopolysaccharide contenant le ribose et le galactose a été particulièrement étudié à cause de sa ressemblance avec les lipopolysaccharides T1 . Mais les liaisons des sucres sont différentes et on ignore encore si les sucres sont présents sous forme de furanosides ou de pyranosides. Il semble , en outre, qu'il n'existe aucun rapport

sérologique entre les deux antigènes.

La combinaison des résidus furanosidiques du ribose et du galactose dans les chaînes T1-spécifiques en font un matériel unique.

Dans une prochaine étape il s'agira de déterminer la séquence des sucres de ces chaînes.

C H A P I T R E IV

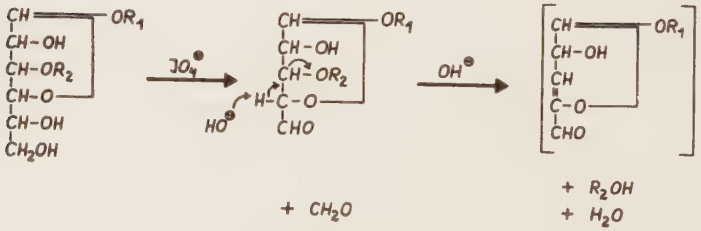
MISE EN EVIDENCE DE CHAINES DISTINCTES DE POLY-RIBOSE ET DE POLY-GALACTOSE DANS LES LIPOPOLY-SACCHARIDES T1

I. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent il a été montré que la dégradation par oxydation periodique n'attaquait pas le ribose et donnait naissance à du L-arabinose et à du thréitol à partir du galactofuranose.
Il nous a semblé que la dégradation par le periodate pourrait fournir de plus amples informations quant à la structure des chaînes T1-spécifiques. Pour cela on a fait appel à deux méthodes d'oxydation.

Dans un premier stade on peut prévoir qu'une oxydation ménagée au periodate va donner un produit de dégradation où seul le galactose substitué en C3 sera oxydé et transformé en restes d'arabinose (1-5)-dialdéhyde. Le lipopolysaccharide dégradé sera alors un substrat convenant à une élimination du substituant porté en position ß (C3) par rapport au groupement aldéhyde nouvellement formé (Ghuysen 1968) après traitement alcalin (voir la formule IV, 1). Le reste de la molécule reste inchangé.

Formule IV, 1



Elimination ß

Une oxydation à température ambiante , est poussée jusqu'à un plateau où il n'y a plus consommation de periodate ; le galactose est dégradé soit en arabinose , soit en thréitol. Quand on hydrolyse le lipopolysaccharide T1 oxydé totalement puis réduit , dans des conditions douces, les liaisons qui relient les résidus de galactofuranose substitués en C6 au sucre suivant devraient être rompues préférentiellement (dégradation selon Smith voir Goldstein et al. 1965). C'est l'étude des fragments obtenus après ces traitements qui sera discutée dans ce chapitre.

II. RESULTATS

A) Comparaison entre les échantillons ayant subis une oxydation ménagée ou prolongée

Pour vérifier le matériel de départ avant l'élimination ß et la dégradation selon Smith, des échantillons ont été prélevés après oxydation ménagée et prolongée. Après réduction, ils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse de leurs acétates d'alditols. Le tableau IV,1 montre une analyse comparative des sucres de ces lipopolysaccharides T1 oxydés partiellement et puis réduit (b), oxydés totalement puis réduits (c), et du lipopolysaccharide d'origine (a).

Après oxydation ménagée (préparation b) environ 60 % du galactose est dégradé avec formation d'une quantité équivalente d'arabinose. Cette oxydation ne touche que le galactose substitué en position C3 . Ceci est important pour la dégradation alcaline (élimination ß). Aucune trace de thréitol n'a pu être détectée.

Après oxydation totale , pratiquement tout le galactose est dégradé et se retrouve sous forme d'arabinose et de thréitol dans les proportions molaires relatives 2:1 . Les 5 % de galactose non détruit peuvent être dus à du galactose incomplètement oxydé par le périodate et à du galactose disubstitué. Le glucose du "core" est en partie attaqué comme nous l'avons vu précedemment. Le heptose est transformé en mannose. Le ribose reste intact.

Tableau 1 Proportions molaires relatives des constituants des lipopolysaccharides T1 d'origine et dégradés. - Les sucres et le thréitol furent déterminés après hydrolyse et chromatographie en phase gazeuse de leurs alditols acétylés. Le xylose a servi de témoin interne.

Préparations	Rib mole %	Gal mole %	Glu mole %	Hep mole %	Thr mole %	Ara mole %	Man mole %
(a) Lipopolysaccharide T1	38	48	8	6	0	0	0
(b) Lipopolysaccharide T1 oxydé partiellement et réduit	52	18	5	trace	0	25	trace
(c) Lipopolysaccharide T1 oxydé totalement (IO_4^-) et réduit	51	5	3.5	0	13	27	trace

Abbréviations: Rib = ribose; Gal = galactose; Glu = glucose; Hep = heptose; Thr = thréitol; Ara = arabinose; Man = mannose.

B) Réaction d'élimination ß sur le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 après oxydation periodique ménagée

Nous avons étudié ici deux échantillons (voir page 46) L'un représente le lipopolysaccharide T1 oxydé , traité par la soude et non réduit . Dans ce cas le sucre ß-éliminé devrait être réducteur (aldose). Dans le second cas , l'échantillon a été réduit après élimination ß. Le sucre ß-éliminé sera donc réduit et devrait être porteur d'un groupement alcool primaire en C1 (alditol).

Nous obtenons ainsi des fragments de chaînes T1-spécifiques puisque les liaisons en C3 avec l'arabinose, ont été rompues par ce traitement (formule IV,1).

1) Etude des produits oxydés, traités par la soude et non réduits

Après purification (précipitation par l'éthanol) nous obtenons deux préparations .

L'une a une masse moléculaire suffisament élevée pour être précipitable par l'éthanol à 80 % . L'autre est représentée par les surnageants alcooliques. Ces préparations ont été fractionnées sur une colonne de gel de dextrane Sephadex G 15. Les échantillons élués ont été analysés colorimétriquement pour la recherche des pentoses et des hexoses.

a) Fractionnement et étude du précipité

Comme le montre la figure IV,1a la majeure partie de la préparation se retrouve dans un pic unique élué avec le front du solvant. Les échantillons numérotés de 65 à 85 sont réunis et séchés (fraction P) . Le tableau IV,2 montre que la fraction P se compose de grandes quantités de ribose avec une faible participation des sucres du "core". La méthylation a révélé la présence de restes de 3,5-di-O-méthyl-D-ribofuranose et de sucres dérivant de la région du "core" des lipopolysaccharides : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactose 3,4,6-tri-O-méthyl-D-galactose, 3,4,6,-tri-O-méthyl-D-glucose 3,6- et 2,4-di-O-méthyl-D-glucose (Hämmerling et al. 1970) Quelques traces de galactofuranose ont encore pu être détectées.

Tableau 2 Résultats obtenus avec le produit isolé à partir du lipopolysaccharide T1 après oxydation périodique et traitement alcalin (fraction P)

	Ribose	Galactose	Glucose	Heptose*)	Glucosamine*)
mole % des sucres (déterminés par chromatographie en phase gazeuse)	86	8	6	+	++
Substitutions des sucres **) (déterminés par méthylation)	2-substit.f.	non-substit.p. (terminal) 2-substit.p. 3-substit.f. (trace) 6-substit.f. (trace)	2-substit.p. 2,4-substit.p. 3,6-substit.p.		

*) Par méthodes colorimétriques **) p = pyranose, f = furanose

En solution dans l'eau la fraction P forme des solutions opalescentes indiquant la présence de lipoide A. Des échantillons du lipopolysaccharide T1 et de la fraction P ont été hydrolysés par la soude 4 N (4 heures à 100°C). Les hydrolysats ont été extraits par le chloroforme après acidification. Les deux extraits donnent , après évaporation environ 16 % d'un matériel lipidique (acides gras). Dans les deux cas on a pu identifier , par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques, les acides gras caractéristiques du lipoide A (voir tableau II,1; page 52).

b) Fractionnement et analyse des surnageants alcooliques

La fraction neutre obtenue après purification des surnageants par électrophorèse de zone sur papier, a été fractionnée sur colonne de Sephadex G 15 de la même manière que la fraction P (figure IV,1b). On a réuni les échantillons numérotés de 70 à 90 (fraction S1) et les échantillons numérotés de 91 à 150 (fraction S2) de taille moléculaire plus réduite. Après une étude des dérivés méthylés et acétylés, la fraction S1 a montré une structure analogue à celle de la fraction P. La fraction S2, étudiée par chromatographie en couche mince de cellulose et dosée après action de la galactose oxydase (page 36) avant et après hydrolyse, consiste surtout en galactose substitué et en galactose libre. La nature du substituant (sans doute un produit de dégradation du reste arabino-aldéhyde) n'a pas été étudiée.

En résumé, après traitement alcalin (élimination ß) d'un lipopolysaccharide T1 partiellement oxydé on peut isoler une fraction de masse moléculaire élevée constituée par un poly-ribose, par les constituants du "core" et par le lipoide A. Une autre fraction consiste en galactose libre ou substitué.

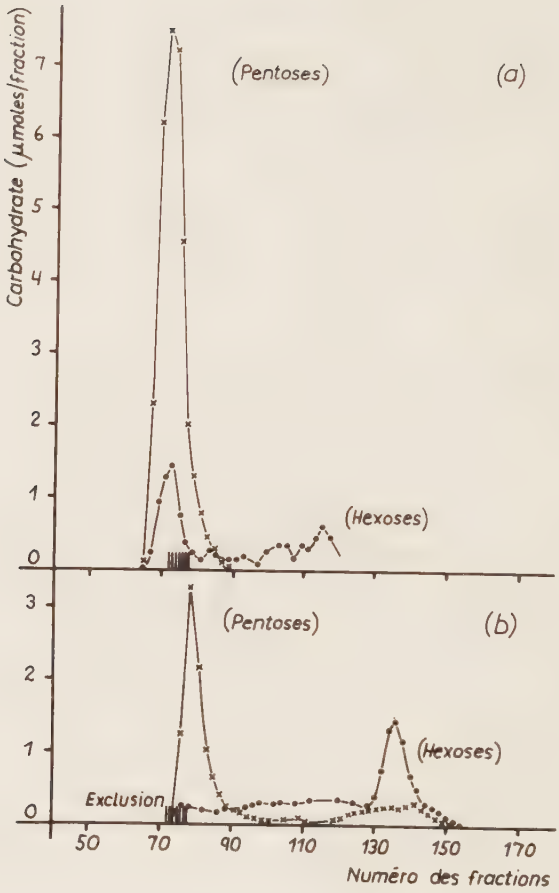


Figure IV,1. Fractionnement sur Sephadex G 15 des fragments obtenus après traitement alcalin du lipopolysaccharide T1 oxydé par le periodate. Après précipitation par l'éthanol, , le précipité : fraction P (a) et les surnageants (b) ont été fractionnés séparément Les échantillons ont été testés pour les pentoses (x-x-x) et les hexoses (o-o-o).

2) Etude du produit oxydé, traité par la soude puis réduit

La fraction neutre obtenue après purification par électrophorèse de zone sur papier (solvant F) a été fractionnée sur une colonne de Sephadex G 15 comme dans le cas précédent . Dans les échantillons élués par l'eau distillée , on a recherché la présence de pentoses (orcinol-chlorhydrique) et de formaldéhyde (libéré après oxydation au periodate de quantités aliquotes prélevées de chaque échantillon). Le formaldéhyde devrait provenir des sucres initialement liés à la position C3 des restes d'arabinose aldéhyde qui ont été ß-éliminés et réduits. Comme le montre la figure IV,2 , le matériel qui donne une réaction positive avec l'orcinol est à nouveau élué avec le front du solvant tandis que le matériel donnant du formaldéhyde se retrouve dans les fractions de poids moléculaire moindre. Les échantillons suivants ont été réunis : fraction N1 tubes 78 à 90 (16,3 mg) , fraction N2 tubes 91 à 133 (2,4 mg) , fraction N3 tubes 134 à 142 (1,4 mg fraction N4 tubes 143 à 149 (3,8 mg), fraction N5 tubes 150 à 156 (2,8 mg) et fraction N6 tubes 157 à 175 (1,6 mg).

Les fractions concentrées ont été étudiées par chromatographie sur couche mince de cellulose après hydrolyse.

La fraction N1 de masse moléculaire supérieure à 1500 est constituée surtout de ribose et de petites quantités des sucres de base du "core". La fraction N3 renferme de grande quantités de galactitol et additionnellement de petites quantités de glucose, galactose et arabinose (identifiés après hydrolyse). La fraction N2 est sans doute un mélange de N1 et de N3. Les fractions N4 et N5 consistent en galactitol libre, identifié par électrophorèse de zone sur papier (solvant G). La fraction N6 contient de l'éthylène glycol ajouté pour détruire l'excès de periodate et qui n'a pu être éliminé totalement (voir page 47).

En résumé, après traitement alcalin et réduction du lipopolysaccharide T1 partiellement oxydé, on a pu mettre en évidence les produits de dégradation suivants : une fraction de masse moléculaire supérieure à 1500 constituée de ribose et de petites quantités des sucres du "core", et des frac-

tions de poids moléculaire plus réduit allant jusqu'aux sucres libres et contenant du galactitol sous forme substituée ou sous forme libre. La présence de petites quantités d'arabinose dans la fraction N3 indique que l'élimination ß n'a pas été quantitative. Les fragments contenant du glucose et du galactose (N3) sont probablement dérivés du "core".

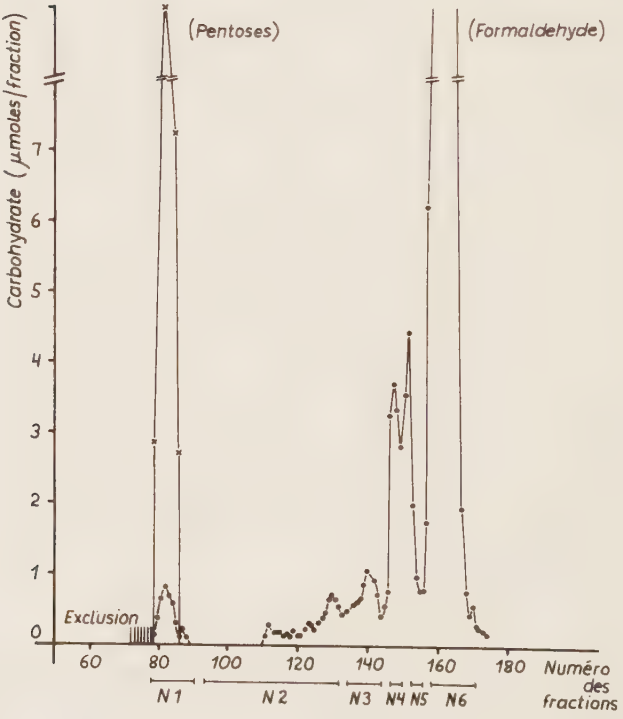


Figure IV,2. Fractionnement sur Sephadex G 15 des fragments obtenus après traitement alcalin et réduction du lipopolysaccharide T1 oxydé partiellement au periodate. Les échantillons sont testés pour les pentoses (x-x-x) et le formaldéhyde (o-o-o) libéré après une oxydation periodique supplémentaire.

c) Dégradation selon Smith du lipopolysaccharide T1 oxydé puis réduit (page 48)

La dégradation selon Smith (Goldstein et al. 1965) comporte une oxydation au periodate de sodium, une réduction au borohydrure de sodium et une hydrolyse ménagée en présence d'un acide minéral dilué. Le principe de cette dégradation repose sur le fait que les liaisons glycosidiques des sucres dont les cycles ont été coupés par oxydation , sont plus sensibles vis à vis des acides que les liaisons des sucres intacts. Dans le cas des lipopolysaccharides T1 , après oxydation totale le cycle furanosidique du galactose substitué en C6 est rompu. On peut s'attendre à ce que la liaison avec le sucre qui précède soit plus sensible à l'hydrolyse acide. Par ailleurs , il faut considérer le fait que les liaisons furanoses sont déjà , per se faciles à hydrolyser.

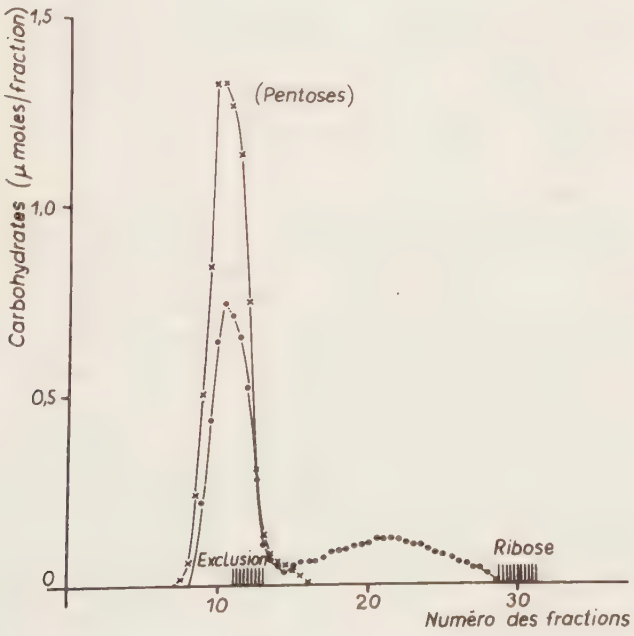


Figure IV,3. Fractionnement sur Sephadex G 200 du lipopolysaccharide T1 avant (x-x-x) et après (o-o-o) hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,1N à 37°C pendant 7 heures. Les échantillons ont été testés pour les pentoses.

Il a donc fallu trouver des conditions d'hydrolyse qui ne coupent que les liaisons des sucres oxydés, en laissant intacts les furanosides (ribose , arabinose). C'est pourquoi le lipopolysaccharide T1 a été soumis à une hydrolyse chlorhydrique sous diverses conditions, en vue d'étudier le degré de dégradation des liaisons furanosides.

La figure IV,3 montre après 7 heures d'hydrolyse (acide chlorhydrique 0,1 N, à 37°C) une légère dégradation du lipopolysaccharide T1 .

C'est pourquoi les lipopolysaccharides T1 oxydés et réduits (60 mg) ont été traités dans les mêmes conditions mais pendant une durée de 3,5 heures seulement.

Une partie aliquote (environ 5 mg) a été fractionnée sur colonne de Sephadex G 200 sous les mêmes conditions que le lipopolysaccharide non dégradé. Comme témoin un lipopolysaccharide T1 oxydé,réduit mais non hydrolysé (5 mg) a été fractionné sur la même colonne. Comme le montre la figure IV,4 la préparation non hydrolysée est éluée avec le front du solvant. Après hydrolyse presque toute la préparation est incluse dans les mailles du gel de Sephadex G 200.

Les 55 mg de lipopolysaccharide T1 dégradé restant sont fractionnés de la même manière sur Sephadex G 200 et les échantillons sont réunis pour donner les fractions A (numéro 8 à 13) et B (numéro 14 à 34). La fraction A représente une faible proportion de l'ensemble. Son analyse a montré la présence de glucose , galactose, mannose, arabinose et d'un peu de ribose et de thréitol. Cette fraction a sans doute échappé à l'hydrolyse. La fraction B (40 mg) représente la majeure partie de l'hydrolysat et renferme du ribose, de l'arabinose, du thréitol et du glycérol (détectés par chromatographie en couche mince de cellulose dans le solvant D). Elle a été refractionnée sur colonne de Sephadex G 15 (1,3 cm x 140 cm) comme cela a été décrit précédemment.

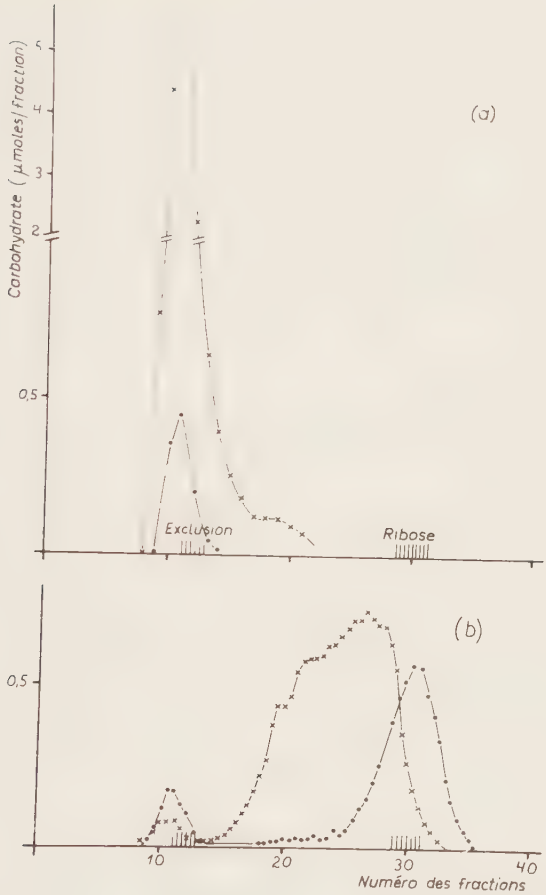


Figure IV,4. Fractionnement sur colonne de Sephadex G 200 du lipopolysaccharide T1 avant (a) et après (b) hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,1 N à 37°C pendant 3,5 heures (dégradation selon Smith). Les échantillons ont été testés pour les pentoses (x-x-x) et le formaldéhyde (o-o-o) libéré après une oxydation periodique supplémentaire.

Comme le montre la figure IV,5 on a pu isoler les fractions suivantes: B1 (échantillons 68 à 84) , B2 (échantillons 109 à 126), B4 (échantillons 127 à 134), B5 (échantillons 135 à 142), B6 (échantillons 143 à 160). Les analyses des sucres ont été faites par chromatographie en couche mince de cellulose dans une étude préliminaire. Puis certaines fractions ont été analysées avant et après une oxydation supplémentaire au périodate de sodium (voir tableau IV,3) par chromatographie en phase gazeuse de leurs acétates d'alditols. Cette nouvelle oxydation doit attaquer le sucre terminal non réducteur des oligosaccharides contenus dans ces fractions.

Dans la fraction B1 (21 mg) on a trouvé du ribose et des traces d'arabinose et de thréitol. Cette fraction est incluse dans les mailles du réseau de Séphadex G 200 et éluée avec le front du solvant sur Sephadex G 15.

Dans les fractions B3 (3,5 mg), B4 (1,4 mg) et B5 (1,6 mg) et B6 (1,7 mg) on n'a trouvé que de l'arabinose et du thréitol. Dans B2 et B3 on a pu déceler également de faibles quantités de galactose. Les proportions de thréitol par rapport à l'arabinose sont d'environ 1:2 dans les fractions B2, B3, B4 et de 1:1 dans la fraction B5. La fraction B6 contient du thréitol et un peu d'arabinose libres (identifiés par chromatographie en couche mince de cellulose, solvant D).

Quand on analyse les fractions B2 et B3 après oxydation au periodate le rapport thréitol : arabinose est de 1:1,4 et de 1:1,3 respectivement.Comme l'arabinose est détruit en partie , on en déduit qu'il doit avoir une position terminale. Le thréitol, qui occupe la place du sucre initialement réducteur , représente la partie la plus sensible à l'hydrolyse de la molécule ; il devrait encore être rattaché au reste de la molécule par l'une de ses fonctions alcool primaire (initialement carbone C6 du galactofuranoside) . Le fait que le thréitol ne soit pas (ou peu) détruit pendant ces oxydations suggère qu'il est substitué dans ces oligosaccharides . Il est très vraisemblable

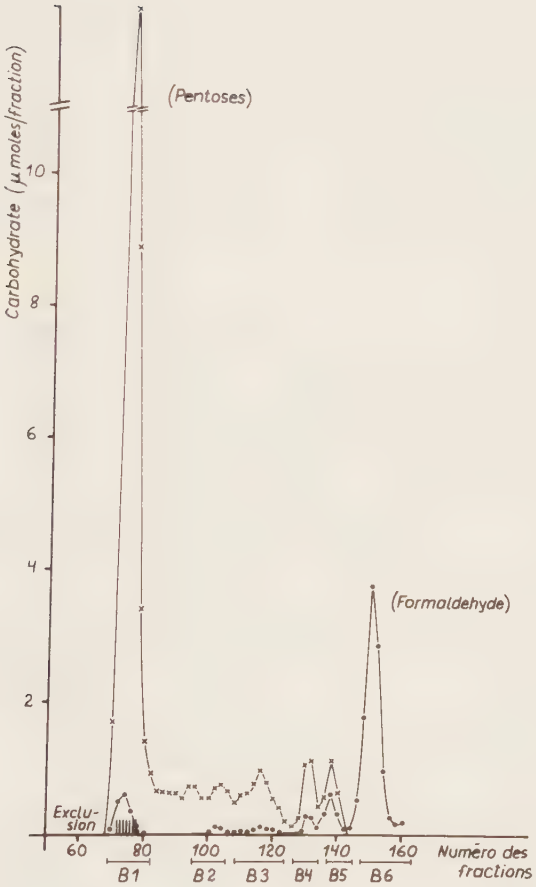


Figure IV,5. Refractionnement sur colonne de Sephadex G 15 de fragments isolés à partir du lipopolysaccharide T1 dégradé selon Smith après fractionnement préliminaire sur colonne de Sephadex G 200 (matériel inclus , voir figure IV,4 :échantillons 14 à 34). Les échantillons ont été testés pour les pentoses (x-x-x) et le formaldéhyde (o-o-o) libéré après une oxydation periodique supplémentaire.

Tableau IV,3 Analyse des fragments obtenus à partir d'un lipopolysaccharide T1 après dégradation selon Smith et fractionnement sur une colonne de Sephadex G 15, avant et après oxydation supplémentaire au periodate de sodium

Fractions	Avant oxydation			Proportion	Après oxydation			Proportion
	thréitol mole %	arabinose mole %	galactose mole %	thréitol: arabinose	thréitol mole %	arabinose mole %	galactose mole %	thréitol: arabinose
B2(1,2mg)	29	61	9	1:2	41	59	(+)	1:1,4
B3(3,5mg)	34	60	6	1:2	44	56	(+)	1:1,3
B4(1,4mg)	31	69	-	1:2,2	67	33	-	1:0,5
B5(1,6mg)	54	46	-	1:0,85	100	0	-	1:0
B6(1,7mg)	+	(+)	-		-	-	-	

Les sucres ont été déterminés après hydrolyse sous forme de leurs alditols acétylés.
Le xylose a été utilisé comme témoin interne.

Abbréviations: + présent
(+) traces
- absent

que le thréitol forme un cycle acétalique avec le glycol aldéhyde dérivant du même galactose (C1 et C2). Ceci sera repris plus en détail dans la discussion .

La destruction d'une unité arabinosyl, les proportions thréitol:arabinose avant et après oxydation et la résistance du thréitol à l'oxydation permet de supposer que B2 et B3 contiennent des dissaccharides d'arabinose liés au thréitol. L'oxydation de B6 ne permet de retrouver aucun des constituants initiaux. Les résultats obtenus pour la fraction B4 ne peuvent être interprétés. Il est possible que cette fraction contienne un mélange d'oligosaccharides.

En résumé, après dégradation selon Smith du lipopolysaccharide T1 on obtient un fragment de masse moléculaire supérieure à 1500 constitué essentiellement de ribose ,et plusieurs oligosaccharides renfermant de l'arabinose et du thréitol. Une dégradation plus poussée des oligosaccharides a montré qu'ils sont sans doute composés de dissaccharides d'arabinose reliés à du thréitol.

D) Comparaison des masses moléculaires des différents produits de dégradation obtenus à partir du lipopolysaccharide T1

Les différentes préparations suivantes ont été comparées entre elles après filtration sur colonne de Sephadex G 200 (1 cm x 35 cm) :

a) La fraction P (élimination ß) comporte une chaine poly-ribose , le polysaccharide du "core" et le lipoide A.

b) Le polysaccharide dégradé T1 (page 32) a perdu le lipoide A à la suite de l'hydrolyse acétique mais renferme du ribose , du galactofuranose et les sucres du "core".

c) La fraction B1 (dégradation selon Smith) est constituée essentiellement de ribose.

d) La fraction P dégradée par hydrolyse acétique est désormais dépourvue de lipoide A.

Ces quatre échantillons sont retenus dans les mailles du réseau de dextrane selon leur taille et leur masse moléculaire. La fraction P est ainsi éluée le plus rapidement avec un

maximum après 24 ml d'éluant (figure IV,6). Les fractions B1 et polysaccharide dégradé migrent à la même hauteur et sont éluées après 26-27 ml de solvant. La fraction P dégradée est très légèrement décalée par rapport aux deux précédentes (maximum après 28 ml). Ces échantillons migrent tous avec le front du solvant sur colonne de Sephadex G25 et sont élués peu après ce front sur Sephadex G 50.

C'est pourquoi la masse moléculaire des produits de dégradation du lipopolysaccharide T1 doit être comprise entre 5000 (Sephadex G 25) et 10 000 (Sephadex G 50).

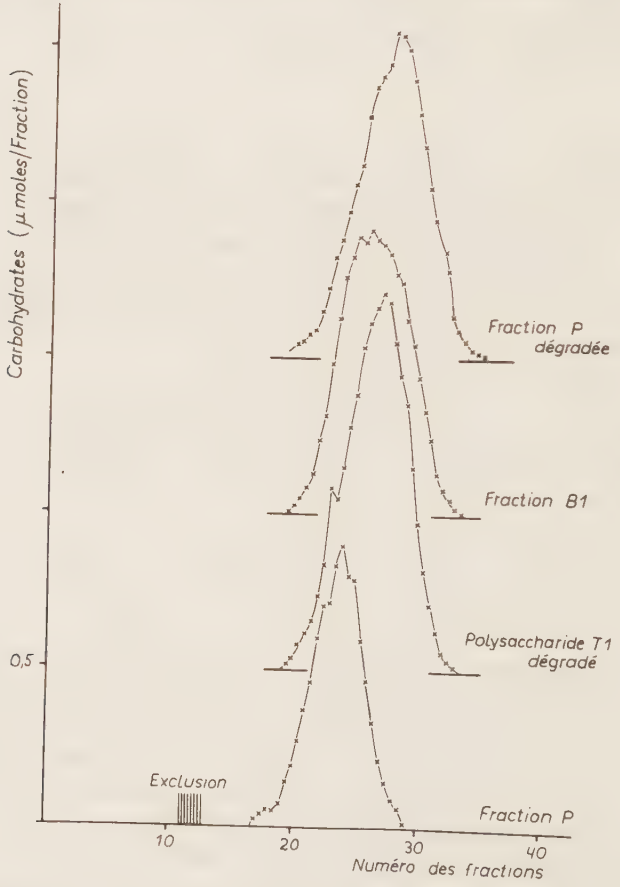


Figure IV,6. Comparaison des masses moléculaires des produits de dégradation du lipopolysaccharide T1 par filtration sur colonne de Sephadex G 200 : a) fraction P obtenue après élimination ß; b) polysaccharide T1 dégradé par l'acide acétique; c) fraction B1 obtenue après dégradation selon Smith ; d) fraction P dégradée par l'acide acétique.
Les échantillons ont été testés pour la présence de pentoses.

E) Etude sérologique du lipopolysaccharide T1 et de ses produits de dégradation

1) Test d'inhibition de l'hémagglutination

Les érythrocytes sur lesquels sont fixés les lipopolysaccharides de S.friedenau T1(après traitement alcalin) ont été agglutinés par le sérum homologue anti S.friedenau T1. Le tableau IV,4 montre les différentes préparations qui ont été utilisées comme inhibiteurs de ce système.

Tableau IV,4. Inhibition de l'hémagglutination du système S.friedenau T1 obtenue avec le lipopolysaccharide T1 et ses produits de dégradation.

No	Inhibiteurs	Quantité minimale provoquant une inhibition (µg)
(1)	Lipopolysaccharide T1	0,125
(3)	Lipopolysaccharide T1 après IO_4^- ménagée et BH_4^-	0,5
(4)	Lipopolysaccharide T1 après IO_4^- totale et BH_4^-	1,0
(5)	Poly-ribose obtenu après élimination ß	63
	Poly-ribose obtenu après élimination ß et BH_4^-	31

Comme prévu le lipopolysaccharide T1 d'origine inhibe bien le système homologue. Les lipopolysaccharides oxydés et réduits agissent également comme de bons inhibiteurs. Les fractions contenant les poly-riboses (après élimination ß) donnent une réaction faible mais positive.

2) Test de précipitation dans l'agar

En présence de sérum anti S.friedenau T1 (figure IV,7) le lipopolysaccharide T1 d'origine comme les lipopolysaccharides oxydés et réduits donnent une ligne de précipi-

tation migrant lentement , proche du point de départ, (trou contenant l'antigène). Cette ligne est faible pour le lipopolysaccharide T1 oxydé totalement et absente dans le cas du polysaccharide T1 dégradé et des différentes préparations de poly-ribose. Tous les échantillons testés donnent, par contre, une double ligne confluente et migrant rapidement. Malgré la confluence il faut remarquer que les lignes obtenues à partir du polysaccharide dégradé et des échantillons de poly-ribose migrent plus rapidement que celles du lipopolysaccharide T1 d'origine ou des lipopolysaccharides oxydés et réduits. Ceci peut être considéré comme une conséquence de leurs masses moléculaires, de leur morphologie ou de leur différence de concentration.

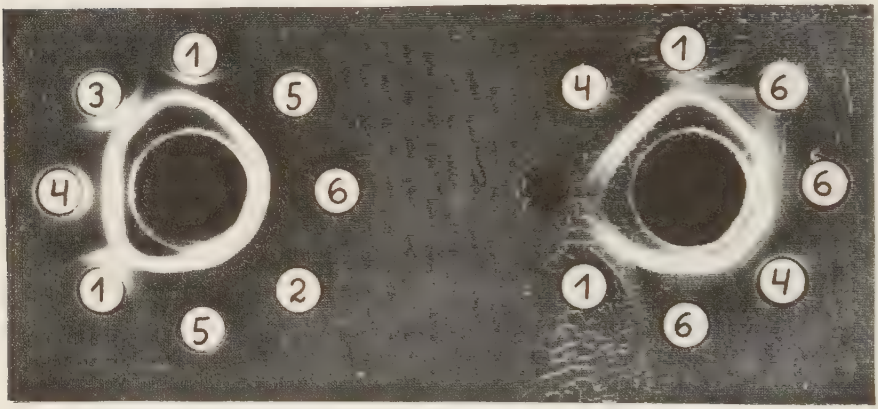


Figure IV,7 . Résultats des tests de précipitation dans l'agar obtenus avec un sérum anti S.friedenau T1 (trou central) et différents antigènes T1 (trous périphériques).Les préparations suivantes ont été testées:
(1) Lipopolysaccharide T1 d'origine
(2) Lipopolysaccharide T1 dégradé par l'acide acétique
(3) Lipopolysaccharide T1 oxydé partiellement et réduit
(4) Lipopolysaccharide T1 oxydé totalement et réduit
(5) Poly-ribose obtenu après élimination ß
(6) Poly-ribose obtenu après dégradation selon Smith.

III. DISCUSSION

Comme il a été montré dans les chapitres précédents le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 est constitué par des chaînes de ribose et de galactose qui remplacent les chaînes O-spécifiques des lipopolysaccharides des bactéries de type sauvage. Ils se présentent sous la forme de ß furanosides . Le ribose est substitué sur le carbone C2, le galactose soit sur C3 , soit sur C6, soit encore sur C3 et C6 (très faible pourcentage). Connaissant la nature des liaisons nous avons essayé d'obtenir dans ce chapitre des informations quant à la structure des chaînes T1-spécifiques grâce à la dégradation par le periodate de sodium suivi d'un traitement alcalin ou acide.

Pour cela deux produits de départ ont dû être préparés par oxydation du lipopolysaccharide T1 au periodate.

Pour l'élimination ß il fallait un produit dans lequel les restes de galactofuranosides substitués sur le carbone C3 étaient oxydés en restes d'arabino-aldéhydes qui portaient le substituant en position ß par rapport au groupement aldéhyde en C5. Après traitement alcalin ce substituant sera éliminé laissant derrière lui un arabinose insaturé qui peut subir d'autres changements (formule IV,1). Dans ce cas le destin des produits de dégradation de l'arabinose n'a pas été suivi.

Le matériel soumis à la dégradation selon Smith doit en plus de l'arabinose contenir des restes oxydés des galactofuranosides substitués en C6. Les liaisons de ces sucres dégradés avec les sucres précédents seront facilement rompues dans des conditions douces (acide dilué). Les deux préparations de départ ont été obtenues soit par oxydation ménagée soit par oxydation totale.

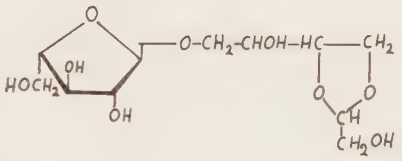
Ces deux méthodes ont mené principalement à un produit de dégradation : un poly-ribose . Les fragments de poly-ribose après élimination ß contiennent aussi des dérivés de la région du "core". Comme le montre l'analyse

des acides gras totaux , le traitement alcalin n'a pas modifié le lipoide A dans ce cas ; on retrouve la même quantité d'acides gras dans le produit ß-éliminé que dans le lipopolysaccharide d'origine. Cette préparation (fraction P) est également celle qui a la masse moléculaire la plus élevée (Sephadex G 200). Les études de méthylation semblent indiquer que ce fragment (poly-ribose ou poly-ribose plus galactose) est relié au "core" par l'intermédiaire du glucose II subterminal du "core" qui est aussi le point d'attache des chaînes O-spécifiques (Nikaido 1969; Berst et al. 1969). On ne peut pas encore dire si la chaîne poly-ribose est liée directement au "core" ou par l'intermédiaire de une ou plusieurs unités galactose. La chaîne poly-ribose obtenue après dégradation selon Smith et le polysaccharide dégradé se comportent de la même manière sur Sephadex G 200. Leur taille semble légèrement inférieure à celle de la fraction P. Ceci peut s'expliquer dans le cas du polysaccharide T1 dégradé , par la perte du lipoide A et une dégradation partielle des chaînes T1-spécifiques lors de l'hydrolyse acétique. La différence entre les poly-riboses obtenus par les deux méthodes s'explique par la présence d'un "core" et d'un lipoide A intacts ou non. La fraction poly-ribose (fraction P) après hydrolyse acétique ménagée présente une taille inférieure aux deux précédentes préparations. Ceci tendrait à montrer que cette fraction était initialement rattachée au lipoide A par l'intermédiaire du "core". Elle aurait maintenant une taille plus réduite par suite de la coupure du lipoide A. Ces différentes préparations ont des masses moléculaires comprises entre 5000 et 10 000 puisqu'elles sont exclues par Sephadex G 25 et incluses dans Sephadex G 50. Toutes ces réactions de dégradation ne donnent pas la possibilité d'isoler un fragment poly-galactose puisqu'elles sont basées précisement sur la dégradation du galactose. Jusqu'ici nous n'avons pas encore de réaction ne dégradant que le ribose.

Cependant après dégradation selon Smith nous avons pu isoler des oligosaccharides contenant de l'arabinose et du thréitol dans les rapports 1:1 (fraction B5) et 2:1 (fractions B2 et B3). La structure du premier (B5) a pu être élucidée comme étant celle d'un:

Arabinofuranosyl-1,1-thréitol

Formule IIa.



Cet oligosaccharide appelé B5 après oxydation au periodate donne du thréitol seul. L'arabinose détruit ne peut avoir qu'une position subterminale. Il semble que le thréitol doive porter un substituant puisqu'il résiste à l'action du periodate. Comme l'indique la figure IV,8 il est possible que pendant la réaction , le thréitol forme un cycle acétalique avec le glycol aldéhyde qui reste accroché à l'oligosaccharides et protège l'ensemble contre une dégradation plus poussée.

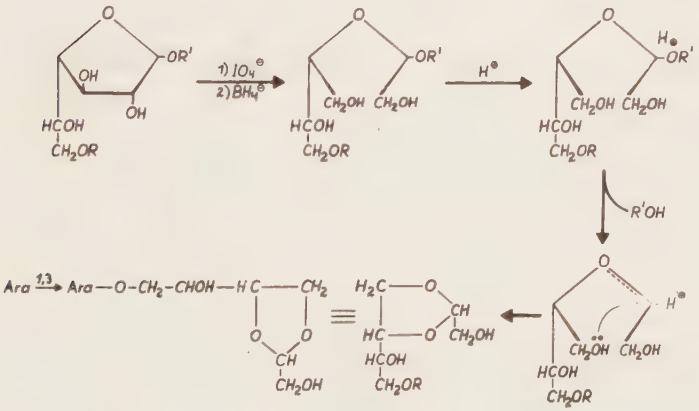
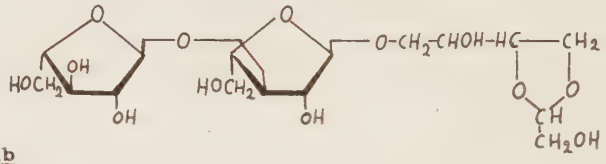


Figure IV,8 . Dégradation selon Smith du galactofuranoside substitué en position C6 avec formation d'un cycle acétalique.

Nikaido a trouvé un fragment similaire sous des conditions analogues (1969). Il se pourrait que par un mécanisme comparable le thréitol soit lui aussi protégé par un cycle acétalique. Nous en déduisons que B5 peut être représenté par la formule IIa ci-dessus.

La structure de l'oligosaccharide B3 doit être voisine de celle de B5. Avant oxydation le rapport arabinose: thréitol est de 2:1 et après il n'est plus que de 1,3:1 Une unité arabinofuranosyl a été détruite. Mais il est probable que la formation d'un cycle acétalique à partir du thréitol ne soit pas quantitative. Si une partie du thréitol était détruite au cours de la seconde oxydation cela expliquerait les valeurs trop élevées trouvées pour l'arabinose (1,3). Il semble que l'on puisse admettre que la structure de cet oligosaccharide B3 est celle d'un:

Arabinofuranosyl-1,3-arabinofuranosyl-1,1-thréitol

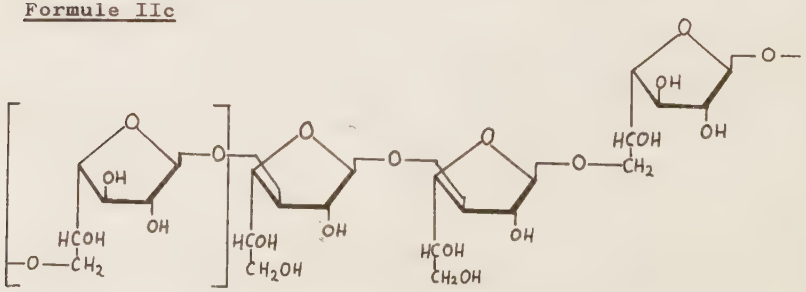


Formule IIb

Après la dégradation selon Smith un tel fragment ne peut être obtenu qu'à partir d'un trisaccharide du galactose avec les liaisons suivantes:

(-6-Galf-1,)3-Galf-1,3-Galf-1,6-Galf-1,

Formule IIc



La présence d'un tel fragment dans les chaînes T1-spécifiques suggère la possibilité d'unités répétées de ce trisaccharide formant une chaîne de poly-galactose.

Une autre preuve de l'existence de régions composées de galactose nous a été fournie par l'étude des fragments oligosaccharidiques obtenus à partir d'un polysaccharide T1 dégradé.

La préparation d'oligosaccharides après hydrolyse ménagée de polysaccharides est une méthode générale permettant l'étude de la structure de ces polysaccharides. Dans le cas du lipopolysaccharide T1 il a fallu choisir des conditions très douces pour obtenir des fragments suffisamment grands, car les liaisons furanosidiques des sucres T1-spécifiques sont très labiles. On a pu, cependant , isoler par chromatographie sur papier à partir de lipopolysaccharides T1 dégradés, une série de 15 fractions. Leur analyse a montré que ces fractions étaient constituées de mélanges d'oligosaccharides voisins qu'il n'a pas encore été possible de purifier . Il ressortait pourtant de cette étude un fait significatif et inattendu : les oligosaccharides de grande taille contiennent presqu'exclusivement du galactose. Cela représente la première indication de l'inhomogénéité des chaînes T1 qui ne peuvent , sans doute , pas se présenter sous forme d'unités de répétition oligosaccharidiques selon le schéma classique.

Il est clair que contrairement à la structure des chaînes O-spécifiques , la <u>région T1- spécifique est hétérogène</u>. Les unités ribose sont assemblées en longues chaînes linéaires . Les unités galactose sont rassemblées en unités tétrasaccharidiques. D'après les résultats obtenus il semblerait que l'on soit plutôt en présence d'unités trisaccharidiques formées par une unité galactose liée en C6 et deux unités galactose liées en C3. Il est probable que le tétrasaccharide précédant ne soit en fait qu'un trisaccharide contenant une unité du trisaccharide suivant. Dans ce cas la partie galactose des chaînes T1 consisterait en unités répétées de ce trisaccharide. Jusqu'ici il n'a pas été

possible de situer les points de branchement dans les chaînes T1. Il est évident qu'il doit y avoir des branchements puisqu'on a pu identifier de petites quantités de galactose substitué en C3 et C6. On peut considérer deux possibilités:
a) La chaîne de ribose comporte quelques résidus de galactose qui servent de liens avec la chaîne galactose.
b) Les chaînes de galactose sont indépendantes des chaînes de ribose et sont elles-même branchées.
Dans le dernier cas il faudrait admettre que les chaînes de ribose et de galactose sont liées à des tronçons différents du "core" .Ce concept contredit les expériences. En effet si les chaînes de poly-ribose et de poly-galactose sont synthétisées et transférées indépendamment sur le "core", il devrait exister des mutants bloqués dans la synthèse soit de l'une soit de l'autre. De tels mutants n'ont jamais pu être isolés jusqu'ici. C'est pourquoi nous préférons à présent la théorie selon laquelle la chaîne de ribose porte une (ou plusieurs) chaînes latérales composées de séquences d'unités trisaccharidiques du galactose.

Des études sérologiques comparatives faites avec des lipopolysaccharides d'origine ou dégradés , ont montré le rôle important joué par le ribose dans la détermination de la spécificité T1. Dans les lipopolysaccharides T1 oxydés au periodate , où toutes les unités galactofuranosidiques sont détruites , les chaînes de poly-ribose réagissent toujours avec l'antisérum T1 aussi bien dans les tests d'inhibition de la hémagglutination que dans les tests de précipitation dans l'agar.

Le mécanisme de la biosynthèse du lipopolysaccharide T1 est encore inconnu. Nikaido a montré récemment que le précurseur du galactofuranose était l'UDP-galactopyranose. L'origine du ribose reste obscure. Baddiley put isoler un UDP-α-D-galactofuranose intermédiaire dans la biosynthèse de résidus galactofuranosyl dans le galactocarolose (liaisons β1,5) produit par Penicillium charlesii (Trejo et al. 1970).

Ces chaînes polysaccharidiques T1 constituées exclusivement de furanosides sont des produits naturels très rares.

Bien qu'une grande quantité de faits soit connue en ce qui concerne la structure du lipopolysaccharide T1, l'élucidation de sa structure finale reste un défi pour les chimistes. Il reste aussi à éclaircir le problème de sa biosynthèse, de la génétique responsable de la mutation T1 et surtout la signification physiologique d'une telle mutation pour la bactérie.

CONCLUSION

Au cours du travail qui a fait l'objet de cette thèse nous avons étudié la composition et la structure de l'antigène somatique de mutants T1 des Salmonellos isolés récemment Notre étude a porté particulièrement sur le lipopolysaccharide (ou antigène T1) extrait de Salmonella friedenau.

Nous avons montré que le lipopolysaccharide T1 contient le lipoide A et les sucres du "core" commun à toutes les Salmonelles étudiées jusqu'ici , c'est à dire , l'acide 2-céto-3-desoxy-D-manno-octulosonique, le L-glycéro-D-manno-heptose, le D-glucose, le D-galactose et la N-acétyl-D-glucosamine. Il comporte en plus de grandes quantités de D-ribose et de D-galactose qui se révèlèrent comme les sucres T1-spécifiques.

Ces deux derniers sucres sont présents sous forme de furanosides. Leurs liaisons ont été identifiées par analyse du lipopolysaccharide T1 méthylé et acétylé. Le galactofuranose est lié en C3 et en C6 ; le ribofuranose est lié en C2 exclusivement. Seules de faibles quantités de sucres terminaux (ribofuranose et galactofuranose) et de sucres disubstitués (galactofuranose lié en C3 et C6) indiquant des points de branchement, ont pu être mis en évidence.

Tous les sucres T1-spécifiques forment des liaisons ß-glycosidiques.

Ces études ont montré que le point d'attache des chaînes T1 est le même que celui des chaînes O-spécifiques c'est à dire sur le carbone C4 du glucose subterminal du "core". IL faut remarquer aussi que seulement un tronçon du "core" sur trois est substitué par des chaînes T1-spécifiques , les autres sont libres.

Pour l'étude des chaînes T1 nous avons fait appel à deux méthodes de dégradation qui commencent toutes deux par une oxydation au periodate : l'élimination ß (traitement alcalin du produit oxydé) et la dégradation selon Smith (traitement acide du produit oxydé et réduit).

Nous avons pu admettre la présence dans les chaînes T1-spécifiques:

a) d'une chaîne poly-ribose (liasons ß 1⟶ 2)

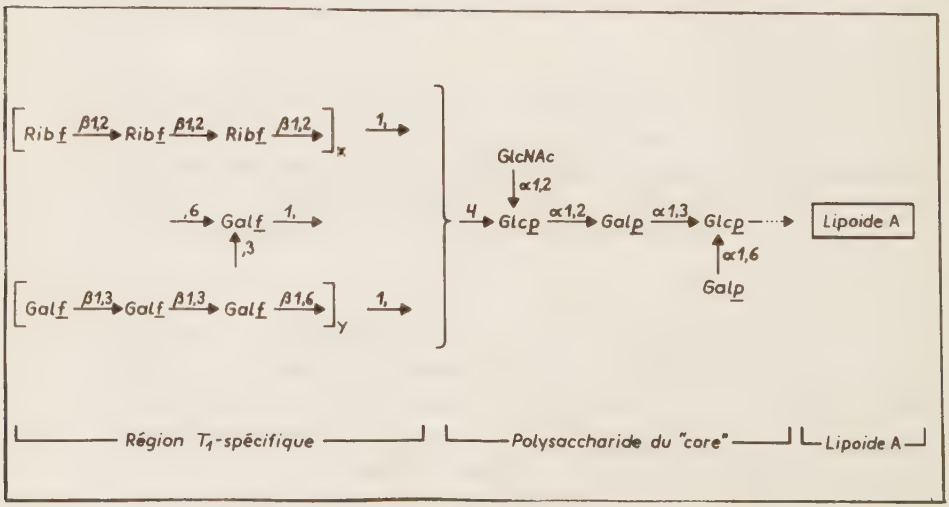
b) d'une région formée par des fragments trisaccharidiques qui proviennent eux-même de fragments plus grands.

(,6-D-Galf-ß1,)3-D-Galf-ß1,3-D-Galf-ß1,6-Galf-

Une autre preuve de l'héterogénéité des chaînes T1 est fournie par l'étude des oligosaccharides obtenus à partir d'un polysaccharide dégradé de S.friedenau T1 . Dans ce cas les fragments de grande taille sont constitués presque exclusivement de galactofuranosides.

Les lipopolysaccharides d'autres mutants T1 comme S.typhi murium, S.paratyphi B et S.dessau semblent renfermer des chaînes de ribofuranosides et de galactofuranosides d'inégale longueur.

Le schéma ci-contre donne une vue d'ensemble de la structure des lipopolysaccharides de mutants T1 selon l'état de nos connaissances actuelles.



R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

(par ordre alphabétique)

ARCHIBALD,A.R., BADDILEY,J. and BLUMSON,N.L., Adv.Enzymol. 30, 223, (1968).

ARMSTRONG,J.J., BADDILEY,J., BUCHANAN,J.G., DAVISON,A.L., KELEMEN,M., and NEUHAUS,F.C., Nature 184, 247 (1959).

ASHWELL,G., In S.P.Colowick and N.O.Kaplan (ed.), Methods in enzymology, vol.3, Academic Press, Inc., New York, p. 73-105.

AUGESTAD,I. and BERNER,E., Acta Chem. Scand.8, 251 (1954).

AVERY,O.T., Naturwissenschaften 21, 777 (1933).

BAGDIAN,G., DRÖGE,W., KOTELKO,K., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Biochem. Z. 344, 197 (1966).

BECKMANN,I., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Biochem.Z.339, 401 (1964a).

BECKMANN,I., SUBBAIAH,T.V., and STOCKER,B.A.D., Nature 201, 1299 (1964b).

BEMILLER,J.N., Adv.Carbohydr.Chem. 22, 25 (1967).

BERST,M., HELLERQVIST,C.G., LINDBERG,B., LÜDERITZ,O., SVENSSON,S., and WESTPHAL,O., European J.Biochem. 11, 353 (1969).

BINKELEY,F., GOEBEL,W.F. and PERLMAN,E., J. Exptl. Med. 81, 331 (1945).

BLADEN,H.A., and MERGENHAGEN,S.E., J.Bact. 88, 1482 (1964).

BJÖRNDAL,H., LINDBERG,B., and SVENSSON,S., Acta Chem. Scand. 21, 1801 (1967a).

BJÖRNDAL,H., LINDBERG,B., and SVENSSON,S., Carbohydr.Rev. 5, 433 (1967b).

BOIVIN,A., MESROBEANU,I., and MESROBEANU,L., Compt.Rend. Sec. Biol. 113, 490 (1933).

BOIVIN,A., and MESROBEANU,I., Revue d'Immunol. 1, 553 (1935).

BOURNE,E.J., HUTSON,D.H., and WEIGEL,H., Biochem.J. 79, 549 (1961).

BROWN,A.H., Arch.Biochem.Biophys. 11, 276 (1946).

BURTON,H.I., and CARTER,H.E., Biochemistry 3, 411 (1964).

CHERNIAK,R., and OSBORN,M.J., Federation Proc. 25, 410 (1966).

CHIZHOV,O.S., GOLOVKINA,L.S., and WULFSON,N.S., Izv.Akad. Nauk SSSR. Ser.Khim 1915, (1966).

CLARK,P.H. and LILLY,M.D., Nature 195, 516 (1962).

DISCHE,Z., and SHETTLES,L.B., J.Biol.Chem. 192, 579 (1951).

DISCHE,Z., SHETTLES,L.B., and OSNOS,M., Arch.Biochem. 22 169 (1949).

DREYWOOD,R., Ind.Eng.Chem.Anal.Ed., 18,499 (1946).

DRÖGE,W., LÜDERITZ,O. and WESTPHAL,O., Europ.J.Biochem. 4, 126 (1968).

DYER,J.S., Methods Biochem.Analy. 3, 111 (1956).

FISCHER,G.G., and DÖRFEL,H., Z.Physiol.Chem. 301, 224 (1955).

FISCHER,W. and ZAPF,J., Z.Physiol.Chem. 337, 186 (1964).

FOSTER,A.B., DAVIES,D.A.L., and CRUMPTON,M.J., Nature 181, 412 (1958).

FREEMAN,G.G., Biochem. J. 36, 340 (1942).

GALANOS,C., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Eur.J.Biochem. 9, 245 (1969a).

GALANOS,C., LÜDERITZ,O., and HIMMELSPACH,K., Eur.J.Biochem. 8, 332 (1969b).

GALANOS ,C., RIETSCHEL,E.Th., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O. European J. Biochem. 1971 (sous presse)

GHALAMBOR,M.A., LEVINE,E.M., and HEATH,E.C., J.Biol.Chem. 241, 3207 (1966)

GHUYSEN,J.M., Bacteriol.Rev. 32, 425 (1968)

GMEINER,J., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Eur.J.Biochem. 7, 370 (1969).

GOEBEL,F.W., BINKLEY,F., and PERLMAN,E., J.Exp.Med. 81, 315 et 331, (1945).

GOLDSTEIN,I.J., HAY,G.W., LEWIS,B.A., and SMITH,F., in R.O.WHISTLER (Editor) Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. 5 Academic Press, N.Y. 1965, p. 361.

HAKOMORI,S., J.Biochem. (Tokyo) 55, 205 (1964).

HÄMMERLING,G., Eur.J.Biochem. 15, 48 (1970).

HELLERQVIST,C.G., LINDBERG,B., and SVENSSON,S., HOLME,T., and LINDBERG,A.A., Carbohydr. Res. 8, 43 (1968).

HELLERQVIST,K.G. and LINDBERG,A.A. (1970) sous presse.

HIGASHI,Y., STROMINGER,J.C., and SWEELEY,C.C., Proc.Natl. Acad.Sci. U.S. 57, 1878 (1968).

HORECKER,B.L., In S.P.Colowick and N.O.Kaplan (ed.) Methods in enzymology, vol. 3. Academic Press, Inc., New York, p. 188-190.

HORECKER,B.L., Ann.Rev.Microbiol. 20, 253 (1966).

IKAWA,M., KOEPLI,J.B., MUDD,S.G. and NIEMANN,C., J.Am. Chem. Soc. 75, 1035 (1953); 75, 3439 (1953).

JANCZURA,E., PERKINS,H.R., ROGERS,H.J., Biochem.J. 80, 82 (1961).

KASAI,N., AOKI,Y., WATENABE,T., ODAKA,T., and YAMAMOTO,T., Japan.J.Microbiol. 5, 347 (1961).

KASS,E.H., ATWOOD,R.P., and PORTER,P.J., Bacterial Endotoxins, Landy and Brown (eds.) New Brunswick, N.J., 596 (1964).

KAUFFMANN,F., Enterobacteriaceae, Kopenhagen (1954); Bakteriologie der Salmonella-Species, Verlag Munksgaard, Kopenhagen (1961).

KAUFFMANN,F., Acta Pathol.Microbiol.Scand. 39, 299 (1956).

KAUFFMANN,F., Acta Pathol. Microbiol.Scand. 40, 343 (1957).

KAUFFMANN,F., LÜDERITZ,O., STIERLIN,H., and WESTPHAL,O., Zentr.Bakteriol.Parasitenk.Abt.I Orig. 178, 442 (1960).

KAUFFMANN,F., JANN,B., KRUGER,L., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Zentr.Bakteriol.Parasitenk. Abt. I. Orig. 186, 509 (1962a).

KAUFFMANN,F., KRUGER,L., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Zentr.Bakteriol.Parasitenk.Abt. I Orig. 182, 57 (1962b).

KAUFFMANN,F., Das Kauffmann-White Schema, p.21-26, In Evan.-oyeled (1964).

KICKHÖFEN,B. und WARTH,R., J.Chromat. 33, 558 (1968).

KRUGER,L., LÜDERITZ,O., STROMINGER,J.L., and WESTPHAL,O., Biochem. Z. 335, 548 (1962).

LEIVE,L., Biochem.Biophys.Res.Comm. 21, 290 (1965).

LINDBERG,A.A., J.Gen.Microbiol. 48, 225 (1967).

LINDBERG,B., SILVANDER,B.G. and WACHTMEISTER,C.A., Acta chem. Scand. 18, 213 (1964).

LOSICK,R. and ROBBINS,P.W., J.Mol.Biol. 30, 445 (1967).

LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., and RANDALL,R.J.,

LOWRY,O.H., ROBERTS,N.R., LEINER,K.Y., WU,M.L., and FARR,A.L., J.Biol.Chem. 207, 1 (1954).

LÜDERITZ,O., SIMMONS,D.A.R., STROMINGER,J.L., and WESTPHAL,O., Anal.Biochem. 9, 263 (1964).

LÜDERITZ,O., RISSE,H.R., SCHULTE-HOLTHAUSEN,H., STROMINGER, J.L., SUTHERLAND,I.W., and WESTPHAL,O., J.Bacteriol. 89, 343 (1965).

LÜDERITZ,O., GALANOS,C., RISSE,H.J., RUSCHMANN,E., SCHLECHT,S., SCHMIDT,G., SCHULTE-HOLTHAUSEN,H., WHEAT, R., WESTPHAL,O., and SCHLOSSHARDT,J., Ann.N.Y.Acad. Sci. 133, 349 (1966a).

LUDERITZ,O., STAUB,A.M., and WESTPHAL,O., Bacteriol.Rev. 30, 192 (1966b).

LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Angew.Chem. 78, 172 (1966c).

LÜDERITZ,O., JANN,K., and WHEAT,R., In Comprehensive Biochemistry, M.Florkin et E.H.STOTZ (Eds.) 26A, 105, (1968a).

LÜDERITZ,O., GMEINER,J., KICKHÖFEN,B., WESTPHAL,O. and WHEAT,R., J.Bacteriol. 92, 490 (1968b).

LÜDERITZ,O., Angew. Chemie 9, 649 (1970).

METCALFE,L.D. and SCHMITZ,A.A., Anal.Chem. 33, 363 (1961).

MILES,A.A. and PIRIE,N.W., Brit.J.Exp.Pathol. 20, 83 (1939); 109, 278 (1939).

MORGAN,M.T.I., PARTRIDGE,S.M., Biochem.J. 34, 169 (1940); 35, 1140 (1941).

MÜHLRADT,P., RISSE,H.J., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Eur.J.Biochem. 4, 139 (1968).

MÜLLER-SEITZ,E., JANN,B., and JANN,K., FEBS Letters 1, 31 (1968).

MYAZAKI,T. and YADOMAE,T., Chem. Pharm.Bull., Tokyo 17, 361 (1969).

NAIDE,Y., NIKAIDO,H., MÄKELÄ,P.H., WILKINSON,R.G., and STOCKER,B.A.D., Proc.Natol.Acad.Sci. U.S. 53, 147 (1965).

NATHENSON,S.G., ISHIMOTO,N., ANDERSON,J.S., and STROMINGER, J.L., J.Biol.Chem. 241, 651 (1966).

NATHENSON,S.G., and STROMINGER,J.L., J.Biol.Chem. 237, 3839 (1962).

O'NEILL,G.J., and TODD,J.P., Nature 190, 344 (1961).

NIKAIDO,H., Adv.Enzymol. 31, 77 (1968).

NIKAIDO,H., J.Biol.Chem. 244, 2835 (1969).

NIMMICH,W., Z.f.Immunitätsforschung Bd. 139, 347 (1970).

NOWOTNY,A., J.Bacteriol. 85, 427 (1963); J.Am.Chem.Soc. 83, 501 (1961).

OSBORN,M.J., ROSEN,S.M., ROTHFIELD,L., and HORECKER,B.L., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 48, 1831 (1962).

OSBORN,M.J., ROSEN,S.M., ROTHFIELD,L., ZELEZNICK,L.D., and HORECKER,B.L., Science 145, 783 (1964).

OSBORN,M.J., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 50, 499 (1963).

OUCHTERLONY,Ö., Acta Path.Microbiol.Scand. 25, 186 (1948).

OUCHTERLONY,Ö., Acta Path.Microbiol.Scand. 26, 507 (1949).

OUCHTERLONY,Ö., Progr.Allergy 5, 1 (1958).

PALMER,J.W. and GERLOUGH,T.D., Science 92, 155 (1940).

PERKINS,H.R., Biochem.J. 82, 647 (1962).

PLACKETT,P. and BUTTER,S.H. Biochem.J.90, 201 (1964).

RAISTRICK,H., and TOPLEY,W.E.C., Brit.J.exp.Pathol. 15, 113 (1934); Lancet 1, 252 (1937).

RAO,E.V., BUCHANAN,J.G. and BADDILEY,J., Biochem.J. 100, 801 (1966).

RAO,E.V., WATSON,M.J., BUCHANAN,J.G. and BADDILEY,J., Biochem.J. 111, 547 (1969).

REEVES,R.E., LATOUR,N.G. and LOUSTEAU,R.J., Biochemistry, Easton 3, 1248 (1964).

RIBI,E., MILNER,K.C., and PERRINE,T.D., J.Immunol. 82, 75 (1959).

RIETSCHEL,E.Th., GALANOS,C., TANAKA,A., YSHIDA,M., RUSCHMANN,E., KIM,Y.B., LÜDERITZ,O. and WESTPHAL,O. Eur.J.Biochem. (1971) sous presse

RISSE,H.J., DRÖGE,W., RUSCHMANN,E., LÜDERITZ,O., WESTPHAL, o., and SCHLOSSHARDT,J., Eur.J.Biochem. 1, 216 (1967).

ROBERTS,R.S., J.comp.Pathol. 59, 284 (1952).

ROBERTS,W.K., BUCHANAN,J.G. and BADDILEY,J.Biochem.J. 88, 1 (1963).

ROSEMAN,S., and DAFFNER,I., Analyt.Chem. 28, 1743 (1956).

RUSCHMANN,E., BAYADAL,K., and HAAS,R., Z.Immunitätsforschg., 123, 326 (1962).

RUSCHMANN,E. and LÜDERITZ,O., Zbl.bakt.Abt.I. Orig.(1970), sous presse.

SALTON,M.R.I., Biochim.Biophys.Acta 10, 510 (1953).

SALTON,M.R.I., "Bacterial Anatomy" p. 81, Cambridge Univ. Press (1956).

SALTON,M.R.I., J.Gen.Microbiol. 18, 48 (1959); Biochim. Biophys. Acta 34, 308 (1959); Biochim.Biophys.Acta 52, 329 (1961).

SALTON,M.R.I., "The bacterial cell wall", Elsevier Amsterdam 1964.

SARVAS,M., and MÄKELÄ,P.H., Acta Pathol.Microbiol.Scand. 65, 654 (1965).

SARVAS,M., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Ann.Med.Exp.Fenn. 45, 117 (1967).

SAWARDEKER,J.S., SLONEKER,J.H., and JEANES,A.R., Anal.Chem. 12, 1602 (1965).

SCHLOSSHARDT,J., Zentr.Bakteriol.Parasitenk.Abt.I Orig. 177, 176 (1960).

SCHLOSSHARDT,J., Zentr.Bakteriol.Parasitenk.Abt.I Orig. 192, 54 (1964).

SCHLECHT,S., RING,K., KUTSCHER,J., and ESCHWEILER,W., Zentr.Bakteriol.Parasitenk.Abt.I Orig. 206, 246 (1968).

SCHMIDT,G., JANN,B., and JANN,K., Eur.J.Biochem. 10, 501 (1969).

SHIELDS,R., and BURNETT,W., Anal.Chem. 32, 885 (1960).

SIDDIQUI,I.R. and ADAMS,G.A. Can.J.Chem. 39, 1683 (1961).

SIMMONS,D.A.R., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Biochem.J. 97, 807 (1965).

STANEK,J., CERNY,M., KOCOUREK,J., and PACAK,J., In The Monosaccharide, Academic Press, New York and London - Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1963 p. 275.

STAUB,A.M., TINELLI,R., Compt.Rend.Acad.Sci. 243, 1460 (1956).

STAUB,A.M., TINELLI,R., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Ann.Inst.Past. 96, 303 (1959).

STAUB,A.M. and BAGDIAN,G., Ann.Inst.Past. 110, 849 (1966).

STAUB,A.M., In R.L.Whistler (ed.), Methods in carbohydrate chemistry, Academic Press, Inc., New York, p. 93-95.

STROMINGER,J.L., PARK,J.T., and THOMPSON,R.E., J.Biol. Chem. 234, 3263 (1959).

SUTHERLAND,J.W., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., Biochem.J. 96, 439 (1965).

TAKEDA,Y. and KASAI,N., Yokohama Med. Bull. 3, 224 (1952).

UCHIDA,T., ROBBINS,P.W., and LURIA,S.E., Biochemistry 2, 663 (1963).

VOLKIN,E., and COHN,W.E., In D.Glcik (ed.) Methods of biochemical Analysis. Interscience Publishers, Inc., New York, p. 287-303.

WALKER,J., Biochem.J. 34, 325 (1940).

WARAVDEKAR,V.S., and SASLAW,L.D., J.Biol.Chem. 234, 1945 (1959).

WEIDEL,N., and PELTZER,H., Adv.Enzymol. 26, 193 (1964).

WEINER,J.M., HIGUCHI,T., ROTHFIELD,L., SALTMARSCH-ANDREW, M., OSBORN,M.J., and HORECKER,B.L., Proc.Natl.Acad. Sci. (US) 54, 228 (1965).

WEISSBACH,A., and HURWITZ,J., J.Biol.Chem. 234, 705 (1959).

WESTPHAL,O., LÜDERITZ,O., and BISTER,F., Z.Naturforsch. 7b, 148 (1952).

WESTPHAL,O., Angew.Chem. 64, 314 (1952).

WESTPHAL,O., and LÜDERITZ,O., Angew.Chem.66, 407 (1954).

WESTPHAL,O., Ann.Inst.Pasteur 98, 789 (1960).

WESTPHAL,O., and LÜDERITZ,O., Angew.Chem. 72, 881 (1960).

WESTPHAL,O., and LÜDERITZ,O., Naturwissenschaften 50, 413 (1963).

WESTPHAL,O., and JANN,K., Academic Press, Inc., New York, In R.L.Whistler (ed.) Methods in carbohydrate chemistry, p. 83-91 (1965).

WHEAT,R.W., In Bacterial Endotoxins, M.Landy and W.Braun (eds.) p. 76-80, Rutgers University Press (1964).

WHEAT,R.W., ROLLINS,E.L., LEATHERWOOD,J., and BARNES,R., J.Biol.Chem. 238, 26 (1963).

WHEAT,R.W., BERST,M., RUSCHMANN,E., LÜDERITZ,O., and WESTPHAL,O., J.Bact. 94, 1366 (1967).

WOBER,W., and ALAUPOVIC,P., Europ.J.Biochem. (sous presse).

WORK,E., Biochem.Biophys.Acta 3, 400 (1949); Biochem.J. 45, 17 (1951); Nature 201, 1110 (1964).

WRIGHT,A., DANKERT,M., and ROBBINS,P.W., Proc.Natl.Acad. Sci. (U.S.) 54, 235 (1965).

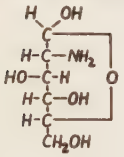
ABREVIATIONS

KDO	Acide 2-céto-3-desoxy-manno-octulosonique
Glc	Glucose
Gal	Galactose
Rib	Ribose
Ara	Arabinose
Fuc	Fucose
Man	Mannose
Hep	L-glycéro-D-mannoheptose
GlcN	Glucosamine
GalN	Galactosamine
P	Phosphate
ATP	Adénosine tri-phosphate
ACL	Antigen carrier lipid
"core"	Noyau polysaccharidique
IO_4^-	Oxydé au periodate de sodium
BH_4^-	Réduit au borohydrure de sodium
S	Smooth (lisse)
R	Rough (rugueux)
nm	Nanomètres
t.p.m.	Tours par minute
N.D.	Non dosé
S.	Salmonella

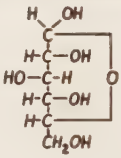
Constituants Présents dans les lipopolysaccharides des Mutants T_4 des Salmonelles

ⓐ Sucres du Noyau de Base

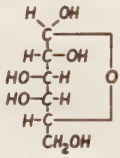
D-Glucosamine (p)



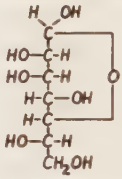
D-Glucose (p)



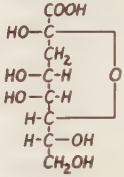
D-Galactose (p)



D-manno-heptose (p)



D-manno-octulosonique (p)

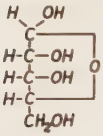


Ethanolamine

Phosphate

ⓑ Sucres T_4-spécifiques

D-Ribose (F)



D-Galactose (F)

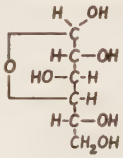


TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ET ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 1

I. STRUCTURE GENERALE DES COUCHES COMPOSANT LA SURFACE DES BACTERIES 2

A) Généralités 2

B) Bactéries à gram négatif..... 2

C) Bactéries à gram positif..... 4

II. LES ANTIGENES O DES SALMONELLES..... 5

A) Classifications sérologique et chimique..... 5

B) Isolement des antigènes somatiques ou lipopolysaccharides..... 7

C) Propriétés biologiques des lipopolysaccharides..... 11

D) Structure des lipopolysaccharides..... 13

1) Généralités..... 13

2) Structure des chaînes O-spécifiques des lipopolysaccharides des Salmonelles..... 15

3) Biosynthèse des chaînes O-spécifiques..... 16

III. LES ANTIGENES OBTENUS A PARTIR DE MUTANTS DES SALMONELLES..... 17

A) Mutants R..... 17

B) Mutants S-R..... 21

C) Mutants T1..... 21

CHAPITRE I.....

MATERIEL ET TECHNIQUES..... 27

I. PREPARATION ET DEGRADATION DU LIPOPOLYSACCHARIDE T1..... 28

A) Obtention des germes..... 28

B) Préparation des parois bactériennes..... 28

C) Extraction selon la méthode de Westphal et Jann (1965)..... 29

D) Extraction selon la méthode de Galanos (1969). 30

E) Traitement alcalin du lipopolysaccharide (Wheat et al. 1967)..... 31

F) Hydrolyse acétique du lipopolysaccharide et préparation du polysaccharide dégradé (Berst et al. 1969)..... 32
G) Purification du polysaccharide T1 dégradé par filtration sur gel Sephadex G200 (Berst et al. 1969)..... 32

II. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES..... 32
A) Préparation des immunsérums..... 32
B) Courbes de précipitations quantitatives et inhibition de la précipitation (Lüderitz et al. 1965)..... 33
C) Inhibition de la hémagglutination (selon Beckmann et al. 1964)..... 34
1) Matériel
2) Méthode
D) Test de précipitation dans l'agar (Ouchterlony)..... 35

III. TECHNIQUES CHIMIQUES..... 36
A) Hydrolyses..... 36
B) Méthodes analytiques et dosages..... 36
1) Dosage du glucose par la glucose oxydase. 36
2) Dosage du galactose par la galactose oxydase..... 36
3) Dosage des hexosamines totaux..... 37
4) Dosage des hexoses totaux..... 37
5) Dosage des heptoses d'après la méthode de Dische remaniée par Osborn (1963)..... 37
6) Dosage des pentoses d'après Brown (1946). 38
7) Dosage de l'acide 2-céto-3-désoxy-octonique (KDO)..... 39
8) Détermination des acides uroniques..... 39
9) Dosage du formaldéhyde..... 39
10) Dosage des protéines..... 39
11) Dosage du phosphore..... 39

TECHNIQUES CHIMIQUES (Suite)

B) Méthodes analytiques et dosages
12) Dosage des acides nucléiques..... 39
13) Dosage des acides gras totaux..... 39
C) Chromatographie sur papier et en couche mince de cellulose..... 40
D) Chromatographie sur colonne..... 40
E) Electrophorèse de zone sur papier..... 40
F) Révélateurs des sucres..... 41
G) Préparation du L-ribose..... 41
H) Dosage des sucres acétylés par chromatographie en phase gazeuse..... 41
I) Méthylation et acétylation (Hakomori 1964)... 42
J) Localisation des groupements O-acétyl..... 44
K) Chromatographie en phase gazeuse et spectrographie de masse..... 45
L) Chromatographie en phase gazeuse des acides gras..... 45
M) Détermination du pouvoir rotatoire dans les polysaccharides T1 pendant une hydrolyse partielle..... 45
N) Réactions de dégradation par oxydation périodique réalisées sur le lipopolysaccharide T1. 46
1) Elimination ß..... 46
a) Oxydation partielle et traitement alcalin..... 46
b) Purification des échantillons..... 46
b.a. Purification du produit oxydé, traité par la soude et réduit..... 46
b.b. Purification du produit oxydé, traité par la soude et réduit..... 47
2) Dégradation selon Smith (Goldstein et al. 1965)..... 47
a) Etude préliminaire..... 47
b) Oxydation totale et hydrolyse du lipopolysaccharide T1..... 48

IV. Isolement de la ribokinase et phosphorylation du ribose..... 48
1) Isolement de l'enzyme..... 48
2) Phosphorylation du ribose..... 49
V. Critique des méthodes..... 49
1) Méthode de dosage..... 49
2) Méthylation..... 50

CHAPITRE II..... 51
I. COMPOSITION CHIMIQUE..... 52
A) Introduction..... 52
B) Etude de la fraction lipidique (lipoide A) et des protéines..... 52
C) Etude des sucres constitutifs..... 54
1) Identification du ribose des lipopolysaccharides T1 comme étant le D-ribose..... 54
2) Présence du D-ribose dans les lipopolysaccharides d'autres Salmonelles..... 56
3) Sucres composant les lipopolysaccharides T1..... 58
4) Composition des lipopolysaccharides dégradés de S.friedenau T1..... 58
a) Lipopolysaccharide dégradé par l'acide acétique..... 58
b) Lipopolysaccharide traité par la soude 0,25N..... 61
c) Lipopolysaccharide oxydé ($NaIO_4$) et réduit (NaBH4)..... 63
5) Comparaison des lipopolysaccharides des formes T1 avec ceux des mutants Ra et Rb.. 64

II. CARACTERISATION SEROLOGIQUE DES (LIPO)POLYSACCHARIDES T1..... 64
A) Inhibition de l'hémagglutination 64
B) Analyse des précipités spécifiques et inhibition de la précipitation des antigènes T1.... 66

II. CARACTERISATION SEROLOGIQUE DES (LIPO)POLYSACCHARIDES T1 (Suite)
B) Analyse des précipités spécifiques et inhibition de la précipitation des antigènes T1
1) Précipitation du lipopolysaccharide T1 et du lipopolysaccharide T1 traité aux alcalis. 66
2) Précipitation des (lipo)polysaccharides T1 oxydés..... 69
3) Inhibition de la précipitation..... 69

III. DISCUSSION..... 71

CHAPITRE III..... 76

LIAISONS DES SUCRES CONSTITUTIFS DES LIPOPOLYSACCHARIDES T1..... 77
I. INTRODUCTION..... 77
II. RESULTATS..... 81
A) Analyse du lipopolysaccharide T1..... 81
B) Analyse des polysaccharides T1 dégradés..... 81
C) Méthylation du lipopolysaccharide T1..... 84
D) Variation du pouvoir rotatoire du polysaccharide T1 dégradé pendant une hydrolyse ménagée..... 90
E) Analyse des polysaccharides T1 oxydés et réduits..... 93
F) Analyse des sucres de différents lipopolysaccharides T1..... 96
III. DISCUSSION..... 97

CHAPITRE IV..... 103

MISE EN EVIDENCE DE CHAINES DISTINCTES DE POLY-RIBOSE ET DE POLY-GALACTOSE DANS LES LIPOPOLYSACCHARIDES T1
I. INTRODUCTION..... 104
II. RESULTATS..... 105

II. RESULTATS (Suite)

A) Comparaison entre les échantillons ayant subis une oxydation ménagée ou prolongée..... 105

B) Réactions d'élimination ß sur le lipopolysaccharide de S.friedenau T1 après oxydation périodique ménagée..... 107

1) Etude des produits oxydés traités par la soude et non-réduits..... 107

a) Fractionnement et étude du précipité... 107

b) Fractionnement et analyse des surnageants alcooliques..... 109

2) Etude du produit oxydé, traité par la soude et réduit..... 111

C) Dégradation selon Smith du lipopolysaccharide T1 oxydé et réduit..... 113

D) Comparaison des masses moléculaires des différents produits de dégradation obtenus à partir du lipopolysaccharide T1..... 119

E) Etude sérologique du lipopolysaccharide T1 et de ces produits de dégradation..... 121

1) Test d'inhibition de l'hémagglutination... 121

2) Test de précipitation dans l'agar..... 121

III. DISCUSSION..... 123

CONCLUSION..... 130

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 133

ABREVIATIONS..... 141

CONSTITUANTS DES LIPOPOLYSACCHARIDES T1..... 142